ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής

Συγκριτική μελέτη των ομφαλικών αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων από τη γέλη του Wharton, σε σχέση με τα μυελικά αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα

Διδακτορική Διατριβή

Αριστέα Κ. Μπάτσαλη

Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης
Επιστημονικά υπεύθυνη:
Ελένη Α. Παπαδάκη,
Καθηγήτρια Αιματολογίας

Ηράκλειο 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος – Ευχαριστίες ***5***

1. Abstract ***6***

2. Περίληψη ***7***

3. Εισαγωγή ***9***

3.1. Βλαστικό κύτταρο ***9***

3.1.1. Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells - ESCs) ***11***

3.1.2. Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα ***12***

- Στελεχιαία/Στρωματικά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Mesenchymal Stromal/ Stem Cells – MSCs) ***13***
- Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών (BM-MSCs) ***17***

3.1.3. Εξωεμβρυϊκά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ***18***

- Ο ομφάλιος λώρος είναι μια πλούσια πηγή MSCs ***19***
- Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton (WJ-MSCs) ***21***

3.2. Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των WJ-MSCs και BM-MSCs ***21***

3.3. Η *in vitro* ικανότητα διαφοροποίησης των MSCs προς άλλες κυτταρικές σειρές ***24***

3.4. Οι ανοσολογικές ιδιότητες των MSCs ***26***

3.5. Η ικανότητα των MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση ***27***

3.6. Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι ***32***

3.6.1. Κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ***33***

3.6.2. Μη – κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ***34***

3.7. Το Wnt στον πολλαπλασιασμό των MSCs ***35***

3.8. Το Wnt στην οστεογένεση ***36***

3.9. Το Wnt στη λιπογένεση ***38***

4. Σκοπός της μελέτης ***40***

5. Υλικά και μέθοδοι ***41***

- Ομάδα μελέτης ***41***
- Απομόνωση WJ-MSCs από τον ομφάλιο λώρο ***41***
- Απομόνωση μυελικών λεμφομονοπύρηνων κυττάρων (BMMCs – Bone Marrow Mononuclear Cells) ***42***
- Μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων ***43***
- Καλλιέργεια και ανάπτυξη BM-MSCs ***44***

- Εκτίμηση της βιωσιμότητας και πολλαπλασιαστικής ικανότητας των MSCs ***46***
- Μελέτη των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των MSCs ***48***
- Μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων με χρώση 7-actinoaminomycin-D (7-AAD) ***49***
- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου ***49***
- Κυτταρογενετική ανάλυση των MSCs ***50***
- Στρώσιμο των μονιμοποιημένων MSCs και χρωμοσωμική ανάλυση ***51***
- Φθορίζων in situ υβριδισμός (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) ***52***
- Εκτίμηση της διαφοροποιητικής ικανότητας των MSCs ***53***
- Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση και λιπογένεση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ***55***
- Εκτίμηση της γήρανσης των καλλιεργούμενων MSCs ***56***
    - Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση
    - Εκτίμηση σχετικού μήκους τελομερών
    - Έλεγχος της επαγωγής της γήρανσης εκτιμώντας την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal)
- Μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών του Wnt και του Κυτταρικού Κύκλου με PCR-Arrays ***59***
- Επαλήθευση των αποτελεσμάτων των PCR Arrays ***66***
- Διερεύνηση του ρόλου δυο μορίων σχετιζόμενων με τα μονοπάτια του Wnt, του sFRP4 και του WISP1 στη διαφοροποίηση των WJ-MSCs ***66***
- Εκτίμηση της ικανότητας των MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση ***67***
- Στατιστική ανάλυση ***69***

6. Αποτελέσματα ***70***

- Τα BM-MSCs και WJ-MSCs παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά ***70***
- Τα BM-MSCs παρουσιάζουν μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα WJ-MSCs ***72***
- Τα BM-MSCs και WJ-MSCs εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά επιβίωσης ***73***
- Διερεύνηση της κυτταρικής γήρανσης των MSCs ***75***
- Υπερέκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου στα WJ-MSCs ***77***
- Το μειωμένο οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs ***80***

- Διαφορετικό προφίλ έκφρασης των μορίων του WNT σηματοδοτικού μονοπατιού μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs. ***82***
- Το sFRP4 ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα ***85***
- Το WISP1 ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα ***86***
- Τα WJ-MSCs διαθέτουν μειωμένη υποστηρικτική ικανότητα αιμοποίησης σε σχέση με τα BM-MSCs ***89***

7. Συζήτηση ***92***

8. Βιβλιογραφικές αναφορές ***100***

9. Πρωτότυπη δημοσίευση ***113***

Στους γονείς μου

Κυριάκο και Ουρανία

στα αδέρφια μου

Αριστομένη και Μαρούσα

στο στήριγμα μου

Μιχάλη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

«Οι ζωές όλων μέσα στο Εργαστήρι μας δεν βαίνουν παράλληλες αλλά συγκλίνουν σε αυτό που λέμε σκέφτομαι τον άλλο, τον σέβομαι, τον αγαπώ…» και πραγματικά μόνο υπό αυτές τις συνθήκες θα μπορούσε να τελειώσει αυτός ο σημαντικός κύκλος για τη ζωή μου. Τα παραπάνω οφείλονται στους ανθρώπους του Εργαστηρίου και δεν θα μπορούσα παρά να τους ευχαριστήσω που με αγκάλιασαν και στάθηκαν δίπλα μου σε μια διαδρομή με δύσκολες στιγμές -άγχους και προβληματισμού, αλλά και χαράς και ενθουσιασμού.

Δεν θα μπορούσα παρά να ξεκινήσω από την καθηγήτρια μου, κα Ελένη Παπαδάκη, την «ενθουσιώδη και αισιόδοξη ψυχή» του Εργαστηρίου μας. Όπως είπε· μπορεί οι ζωές όλων μας να είναι σύντομες σε αυτό το χώρο αλλά σίγουρα δεν είναι περαστικές. Όλοι ανήκουμε πλέον ΕΔΩ. Το ευχαριστώ θα ήταν λίγο για την εμπιστοσύνη και τη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα Μαρία Χατζηνικολαΐδου, Επίκουρη Καθηγήτρια, για την συνεργασία πέραν των πλαισίων της Διδακτορικής Διατριβής μου, και φυσικά το Χάρη Ποντίκογλου, Επίκουρο Καθηγητή, για την πολύτιμη βοήθεια και τη συμβολή του σε αυτή την εργασία.

Για το χρόνο που αφιέρωσαν συμμετέχοντας στην Επταμελή Επιτροπή, ευχαριστώ τον κύριο Γεώργιο Γουλιέλμο, Αναπληρωτή Καθηγητή, τον κύριο Αριστείδη Ηλιόπουλο, Καθηγητή, τον κύριο Γεώργιο Μπερτσιά, Επίκουρο Καθηγητή και τον κύριο Γεώργιο Χαμηλό, Αναπληρωτή Καθηγητή.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ στην υπόλοιπη «οικογένεια» του Εργαστηρίου, Αθηνά Δαμιανάκη, Ειρήνη Μαυρουδή, Σεμέλη Μαστροδήμου, Κωνσταντία Παυλάκη, Ρένα Φραγκιαδάκη, Μαρία Ξημέρη αλλά και την Έλσα Κουβίδη. Δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω και την κα Ελένη Κουταλά για τη σημαντική βοήθεια που συνεχίζει να μου προσφέρει, αλλά και να μην αναφερθώ στα νεότερα μέλη του Εργαστηρίου Φώτη, Νικολέτα, Άντρια, Ασπασία και Κωνσταντίνο που μας έφεραν έναν αέρα ανανέωσης και μαζί συνεχίζουμε την «ερευνητική μας πορεία».

Ευχαριστώ το Μιχάλη για την αγάπη, την υπομονή και την συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τα αδέρφια μου Αριστομένη και Μαρούσα που αν και μακριά, με στηρίζουν και με βοηθούν να συνεχίζω με αισιοδοξία.

Για τους γονείς μου Ουρανία και Κυριάκο, κρατώ το μεγαλύτερο ευχαριστώ για την αγάπη χωρίς ανταλλάγματα που μου δείχνουν κάθε μέρα, ιδιαίτερα όλα αυτά τα χρόνια που είμαι μακριά τους. Τους ευχαριστώ για την κατανόηση και την υπομονή τους αλλά και την κάθε είδους υποστήριξη που μου παρείχαν και μου επέτρεψε να φτάσω ως εδώ. Όσα και αν πω κι αν κατορθώσω δεν είναι αρκετά για να τους δείξω πόσο τυχερή είμαι που τους έχω.

1. ABSTRACT

In view of the current interest in exploring the clinical use of mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources, we performed a side-by-side comparison of the biological properties of MSCs isolated from the Wharton's jelly (WJ), the most abundant MSC source in umbilical cord, with bone marrow (BM)-MSCs, the most extensively studied MSC population. MSCs were isolated and expanded from BM aspirates of hematologically healthy donors (n = 18) and from the WJ of full-term neonates (n = 18). We evaluated, in parallel experiments, the MSC immunophenotypic, survival and senescence characteristics as well as their proliferative potential and cell cycle distribution. We also assessed the expression of genes associated with the Wnt- and cell cycle-signaling pathway and we performed karyotypic analysis through passages to evaluate the MSC genomic stability. The hematopoiesis-supporting capacity of MSCs from both sources was investigated by evaluating the clonogenic cells in the non-adherent fraction of MSC co-cultures with BM or umbilical cord blood-derived CD34+ cells and by measuring the hematopoietic cytokines levels in MSC culture supernatants. Finally, we evaluated the ability of MSCs to differentiate into adipocytes and osteocytes and the effect of the WNT-associated molecules WISP1 and sFRP4 on the differentiation potential of WJ-MSCs. Both ex vivo-expanded MSC populations showed similar morphologic, immunophenotypic, survival and senescence characteristics and acquired genomic alterations at low frequency during passages. WJ-MSCs exhibited higher proliferative potential, possibly due to upregulation of genes that stimulate cell proliferation along with downregulation of genes related to cell cycle inhibition. WJ-MSCs displayed inferior lineage priming and differentiation capacity toward osteocytes and adipocytes, compared to BM-MSCs. This finding was associated with differential expression of molecules related to Wnt signaling, including WISP1 and sFRP4, the respective role of which in the differentiation potential of WJ-MSCs was specifically investigated. Interestingly, treatment of WJ-MSCs with recombinant human WISP1 or sFRP4 resulted in induction of osteogenesis and adipogenesis, respectively. WJ-MSCs exhibited inferior hematopoiesis-supporting potential probably due to reduced production of stromal cell-Derived Factor-1α, compared to BM-MSCs. Overall, these data are anticipated to contribute to the better characterization of WJ-MSCs and BM-MSCs for potential clinical applications.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συνεχώς αυξανόμενο είναι το ενδιαφέρον για τη χρήση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem/Stromal Cells–MSCs) σε κλινικές εφαρμογές. Το ενδεχόμενο MSCs από ποικίλες πηγές να ικανοποιούν διαφορετικές κλινικές εφαρμογές μας ώθησε στην παρούσα μελέτη. Έτσι πραγματοποίησαμε μια συγκριτική μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων MSCs προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (Wharton's Jelly–WJ), την πιο πλούσια πηγή MSCs του ομφαλίου λώρου, και MSCs από τον μυελό των οστών (Bone Marrow–BM), του πιο εκτενώς μελετημένου πληθυσμού μεσεγχυματικών κυττάρων.

Στη διάρκεια της μελέτης, MSCs απομονώθηκαν από τον μυελό αιματολογικά υγιών δοτών (n=18) και από τη γέλη του Wharton νεογνών πλήρους κυήσεως (n=18). Τα MSCs καλλιεργήθηκαν *ex vivo* για συνολικά δέκα ανακαλλιέργειες (Passage–P) υπό τις ίδιες συνθήκες. Σε παράλληλα πειράματα μελετήθηκαν τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων καθώς και χαρακτηριστικά που αφορούν την επιβίωση και την κυτταρική γήρανση όπως το δυναμικό πολλαπλασιασμού και η κατανομή τούς στον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον εκτιμήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του Wnt και του κυτταρικού κύκλου, ενώ πραγματοποιήθηκε και κυτταρογενετική ανάλυση των *ex vivo* καλλιεργούμενων MSCs ώστε να εκτιμηθεί η γενωμική τούς σταθερότητα. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η ικανότητα των MSCs, και από τις δύο πηγές, να υποστηρίζουν την ανάπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, εκτιμώντας τη κλωνογονική ικανότητα των μη-προσκολλούμενων κυττάρων (Non Adherent Cells–NACs) σε συν-καλλιέργειες φυσιολογικών CD34+ κυττάρων, με BM-MSCs ή WJ-MSCs. Επίσης μετρήθηκαν τα επίπεδα κυτταροκινών που σχετίζονται με την αιμοποίηση στα υπερκείμενα των MSC καλλιεργειών. Τέλος, εκτιμήθηκε η ικανότητα διαφοροποίησης των MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα καθώς και η επίδραση των σχετιζόμενων με το Wnt-μονοπάτι μορίων WISP1 και sFRP4 στο δυναμικό διαφοροποίησης των WJ- MSCs.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε πως και οι δυο *ex vivo* καλλιεργούμενοι MSC πληθυσμοί (BM-MSCs ή WJ-MSCs) εμφανίζουν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον δεν διέφεραν ως προς χαρακτηριστικά επιβίωσης και κυτταρικής γήρανσης, ενώ φάνηκε να φέρουν γενετικές αλλαγές σε πολύ χαμηλή συχνότητα στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών. Τα WJ-MSCs εμφάνισαν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, πιθανότατα λόγω ενεργοποίησης γονιδίων που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονης

υποέκφρασης γονιδίων που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο, τα WJ-MSCs παρουσίασαν μειωμένη ενδογενή δέσμευση προς κάποια σειρά (lineage-priming) καθώς και μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα, συγκριτικά με τα BM-MSCs. Το παραπάνω εύρημα συσχετίστηκε με τη διαφορετική έκφραση μορίων που σχετίζονται με το Wnt-σηματοδοτικό μονοπάτι, περιλαμβανομένων των WISP1 και sFRP4, και διερευνήθηκε αντιστοίχως η εμπλοκή του καθενός μορίου στη διαφοροποίηση των WJ-MSCs. Μάλιστα χορήγηση των ανασυνδιασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών WISP1 και sFRP4 στα καλλιεργούμενα WJ-MSCs οδήγησε σε επαγωγή και βελτίωση της οστεογενετικής και λιπογενετικής ικανότητας των κυττάρων, αντιστοίχως. Τέλος, τα WJ-MSCs εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα να υποστηρίζουν την αιμοποίηση σε σχέση με τα ομολογά τούς μυελικά, πιθανότατα εξαιτίας της μειωμένης παραγωγής του παράγοντα του «στρώματος» SDF-1α (stromal cell-derived factor-1α).

Συμπερασματικά τα μέχρι στιγμής δεδομένα συμβάλλουν στον καλύτερο χαρακτηρισμό των WJ-MSCs και των BM-MSCs αναδεικνύοντας τις ιδιαίτερες βιολογικές τους ιδιότητες, που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά την επιλογή της καλύτερης πηγής MSCs για καθεμιά κλινική εφαρμογή.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Βλαστικό κύτταρο

Τα τελευταία χρόνια το πεδίο της Βιολογίας κατακλύζεται συνεχώς από νέα δεδομένα που αφορούν τα βλαστικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τις προβαθμίδες όλων των κυττάρων του σώματος και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση και την επιδιόρθωση των περισσότερων ενήλικων ιστών.

Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε ποικίλες κυτταρικές σειρές. Κατά τη διαίρεση τους έχουν τη δυνατότητα είτε να παραμείνουν βλαστικά είτε να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα με συγκεκριμένη λειτουργία και να ανασυστήσουν τον ξενιστή *in vivo* (Abdulrazzak et al., 2010).

Οι ερευνητές τα τελευταία χρόνια προσπαθούν να κατανοήσουν τις ιδιότητες αυτών των κυττάρων, να τα κατευθύνουν σε μονοπάτια διαφοροποίησης και να δημιουργήσουν συνθήκες υπό τις οποίες τα βλαστικά κύτταρα να αυτοανανεώνονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η διερεύνηση και η αποκωδικοποίηση των μοναδικών και ιδιαίτερων ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων αναμένεται να βοηθήσει στην κατανόηση των βιολογικών τούς μηχανισμών οδηγώντας στην ανεύρεση δυνητικών θεραπειών και κλινικών εφαρμογών.

Πιο αναλυτικά, τα βλαστικά κύτταρα είναι ένας πληθυσμός μη διαφοροποιημένων κυττάρων με τις ακόλουθες ιδιότητες: α) ένα βλαστικό κύτταρο κατά τη διαίρεσή του μπορεί να δίνει ένα τουλάχιστον απόγονο πανομοιότυπο με το αρχικό κύτταρο. Έτσι τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να αυτοανανεώνονται για απεριόριστο χρονικό διάστημα χωρίς να εμφανίσουν γήρανση (Deans and Moseley, 2000), και παράλληλα να διατηρείται ο πληθυσμός τούς στον οργανισμό, β) ένα βλαστικό κύτταρο καθώς διαφοροποιείται αποκτά εξειδικευμένα χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου δίνοντας προγονικά κύτταρα αυτού του τύπου ή στο τέλος πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε κύτταρα που αντιστοιχούν σε περισσότερους του ενός ιστού χαρακτηρίζονται πολυδύναμα.

Συνοψίζοντας, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να δίνουν γένεση σε θυγατρικά κύτταρα, απόλυτα όμοια με το μητρικό (**αυτοανανέωση**), καθώς επίσης και να δημιουργούν

γενεές κυττάρων με περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης (**προβαθμίδες διαφοροποιημένων κυττάρων**).

Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους σε εμβρυϊκά, ενήλικα ή σωματικά και σε επαγόμενα πολυδύναμα. Επιπλέον ανάλογα με την πλαστικότητά τους, δηλαδή το εύρος του δυναμικού διαφοροποίησης, κατηγοριοποιούνται σε: ***ολοδύναμα***, ***πλειοδύναμα***, ***πολυδύναμα***, ***ολιγοδύναμα*** και ***μονοδύναμα*** βλαστικά κύτταρα.

Πιο αναλυτικά, α. Τα ***ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα*** *(*Totipotent Stem Cells) είναι η πλέον αδιαφοροποίητη μορφή κυττάρων που συναντώνται κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη. Ως ολοδύναμο κύτταρο μπορεί να χαρακτηριστεί ένα γονιμοποιημένο ωοκύτταρο (ζυγωτό) μέχρι το στάδιο των πρώιμων βλαστομεριδίων, έως την δεύτερη κυτταρική διαίρεση, δηλαδή τρεις με τέσσερις ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του οργανισμού συμπεριλαμβανομένου και του πλακούντα. β. Τα ***πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα*** (Pluripotent Stem Cells) είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς τύπους και των τριών εμβρυικών σειρών – εξωδερμικής, μεσοδερμικής, ενδοδερμικής προέλευσης. Από τις τρείς βλαστικές στιβάδες προκύπτουν στη συνέχεια όλοι οι τύποι κυττάρων για όλους τους ιστούς και τα όργανα (De Miguel et al., 2010). Τα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα εξω-εμβρυϊκών ιστών, όπως ο πλακούντας, με αποτέλεσμα να μην μπορούν από μόνα τους να αναπτύξουν ένα πλήρη οργανισμό, σε αντίθεση με τα ολοδύναμα κύτταρα. Τα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ESCs) που απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) της βλαστοκύστης. Πρόσφατα, οι Takahashi και Yamanaka μαζί με τους συνεργάτες τους δημιούργησαν πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα μέσω επανα-προγραμματισμού των σωματικών κυττάρων (Takahashi and Yamanaka, 2006). Τα κύτταρα αυτά που ονομάζονται επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα (**induced pluripotent stem cells** , **iPSCs**) έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και ιδιότητες με τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs). γ. 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. Μπορούν να προέλθουν από ένα μεγάλο αριθμό ιστών συμπεριλαμβανομένων του μυελού, του λιπώδους ιστού, των

οστών, της γέλης του Wharton, του αίματος του ομφαλίου λώρου και του περιφερικού αίματος (Augello et al., 2010). Τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστούς μεσοδέρματος όπως λιπώδη ιστό, οστά, χόνδρους και μυϊκό ιστό. Ωστόσο μέσω της δια-διαφοροποίησης τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μιας άλλης βλαστικής στιβάδας, όπως σε κύτταρα του νευρικού ιστού (κύτταρα εξωδέρματος) (Barzilay et al., 2009). δ. Τα ***ολιγοδύναμα βλαστικά κύτταρα*** (Oligopotent stem cells) είναι σε θέση να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε δύο ή περισσότερες κυτταρικές σειρές που ανήκουν όμως σε ένα συγκεκριμένο είδους ιστού. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ολιγοδύναμων βλαστικών κυττάρων, καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν τόσο σε μυελοειδή, όσο και σε λεμφοειδή κύτταρα. ε. Τα ***μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα*** (Unipotent stem cells) μπορούν να αυτο-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε έναν μόνο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων σχηματίζοντας μία μόνο κυτταρική σειρά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα βλαστικά κύτταρα των μυών, που σχηματίζουν ώριμα μυϊκά κύτταρα και όχι οποιοδήποτε άλλο κύτταρο (Abdulrazzak et al., 2010; Bentzinger et al., 2013).

3.1.1 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells - ESCs)

Τα ESCs χαρακτηρίζονται ως πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα καθώς έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε ιστούς των τριών πρωτογενών βλαστικών δερμάτων (ενδόδερμα, εξώδερμα και μεσόδερμα) και να δίνουν γένεση στα γαμετικά κύτταρα (Thomson et al., 1998; Verfaillie C, 2009).

Τα ESCs χαρακτηρίζονται από την έντονη ικανότητα αυτοανανέωσης, οπότε είτε με συμμετρική διαίρεση παράγονται δύο κύτταρα πανομοιότυπα με το αρχικό, είτε με ασύμμετρη διαίρεση παράγεται ένα κύτταρο πανομοιότυπο με το αρχικό και ένα κύτταρο που θα ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο μονοπάτι διαφοροποίησης (Lin H, 1997; Wray et al., 2010).

Έτσι λοιπόν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, στο προ-εμφυτευτικό στάδιο του εμβρύου στις 5-6 μέρες μετά τη γονιμοποίηση, σχηματίζεται η εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (ICM), από όπου προέρχονται τα ESCs (Alberts, Johnson et al., 2002). Η βλαστοκύστη έχει δύο στρώματα κυττάρων, την εσωτερική κυτταρική μάζα, η οποία θα σχηματίσει το έμβρυο, και την εξωτερική κυτταρική μάζα, που καλείται τροφοβλάστη ή τροφοεξώδερμα, από όπου θα σχηματιστεί ο πλακούντας. Η διαδικασία αυτή αντικατοπτρίζει την πρώτη εμφανή διαδικασία διαφοροποίησης στο έμβρυο (Fong et al., 1999).

Τα ESCs μπορούν να διατηρούνται σε αδιαφοροποίητη κατάσταση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε *in vitro* καλλιέργεια. Κατά την απομόνωση των ESCs, τα κύτταρα από την εσωτερική κυτταρική στιβάδα διαχωρίζονται από τις τροφοβλάστες και μεταφέρονται σε ένα τρυβλίο καλλιέργειας όπου αναπτύσσουν κυτταρικές σειρές των ESCs υπό πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Μάλιστα, αν εμφυτευτούν σε ένα έμβρυο μπορούν να δώσουν προγονικά κύτταρα τα οποία θα δημιουργήσουν όλους τους ιστούς του εμβρύου εκτός από τον πλακούντα (Alberts, Johnson et al., 2002). Τα ESCs χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταγραφικών παραγόντων και μορίων επιφανείας, που εξυπηρετούν στην ταυτοποίηση τους. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct-4, Nanog και Sox-2 διαμορφώνουν ένα ρυθμιστικό δίκτυο εξασφαλίζοντας την πολυδυναμία των ESCs ενώ παράλληλα καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που ωθούν τα κύτταρα στη διαφοροποίηση (Boyer et al., 2005; Wang et al., 2012). Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 χαρακτηρίζεται ως δείκτης πλειοδυναμίας των ESCs, ενώ τα γλυκολιπίδια SSEA-3 και SSEA-4, και τα αντιγόνα Tra-160 και Tra-1-81, αποτελούν τα πιο συχνά μόρια επιφάνειας για την ταυτοποίηση των ESCs (Adewumi et al., 2007). Τα ESCs που έχουν καλλιεργηθεί σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, χωρίς γενετικές ανωμαλίες πολλαπλασιάζονται όπως μια κυτταρική σειρά. Οι συνθήκες καλλιέργειας των ESCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση τους σε αδιαφοροποίητη κατάσταση.

3.1.2 Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα απαντώνται στο σώμα του οργανισμού μετά τη γέννηση και αποτελούν εξέλιξη των ESCs. Πρόκειται για αδιαφοροποίητα κύτταρα τα οποία εντοπίζονται ανάμεσα σε διαφοροποιημένα κύτταρα, σε ιστούς ή όργανα. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (ή σωματικά βλαστικά κύτταρα) διαθέτουν περιορισμένη δυνατότητα αυτοανανέωσης και περιορισμένη (σε σχέση με τα ESCs) δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους, είναι ωστόσο πολυδυναμικά (Caplan et al., 2007; Bianco et al., 2008; Schipani et al., 2008-2009; Jaishankar et al., 2009).

Τα εν λόγω κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να αυτοανανεώνονται μέσα στο ανθρώπινο σώμα χωρίς να διαφοροποιούνται για μακρά χρονικά διαστήματα, να αναπληρώνουν συνεχώς πληθυσμούς ώριμων κυττάρων, όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα ή να αντικαθιστούν διαφοροποιημένα κύτταρα σε περίπτωση βλάβης ενός ιστού (Shanthly et al., 2006). Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι σχετικά σπάνια μέσα στον οργανισμό και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να αναγνωριστούν και να απομονωθούν. Ένα άλλο βασικό πρόβλημα είναι πως όταν αναπτύσσονται *in vitro*,

δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Verfaillie, 2002).

Ενήλικα βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί σχεδόν από όλα τα όργανα και τους ιστούς του ενηλίκου πλην των γονάδων. Το μεγαλύτερο μέρος των γνώσεων στο πεδίο των ενήλικων βλαστικών κυττάρων έχει προκύψει από τη μελέτη των αρχέγονων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells - HSCs). Τα HSCs είναι πολυδύναμα, εντοπίζονται κυρίως στο μυελό, και από αυτά προέρχονται οι διαφορετικοί τύποι των κυττάρων του αίματος. Τα HSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς στο πεδίο των μεταμοσχεύσεων εδώ και δεκαετίες (Jaishankar et al., 2009).

Ιστορικά η πρώτη αναφορά πως ο μυελός φιλοξενεί πέραν των πολυδύναμων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και μη αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα έγινε πριν από 130 χρόνια από την ομάδα του Cohneim (Prockop,1997). Έπειτα, περί τα μέσα της δεκαετίας του ’70 ο Alexander Friedenstein, ταυτοποίησε αυτόν τον πληθυσμό των μη αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών. Χρησιμοποιώντας υγρές μυελικές καλλιέργειες, οι ερευνητές διέκριναν μεμονωμένες αποικίες κυττάρων προσκολλημένες στην επιφάνεια της καλλιέργειας. Η μορφολογία αυτών των κυττάρων ήταν όμοια με εκείνη των ινοβλαστών (επιμήκες, ατρακτοειδές σχήμα) και διέθεταν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (Pittenger et al., 1999; Bianco et al., 2008; Bianco et al., 2010).

Από την αρχική τους περιγραφή και εξής, τα κύτταρα αυτά έχουν λάβει κατά καιρούς ποικίλες ονομασίες, όπως μονάδες που σχηματίζουν αποικίες ινοβλαστών (colony forming unit-fibroblast, CFUF) ή στελεχιαία μεσεγχυματικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells – MSCs) (Caplan et al., 1991).

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

Τα MSCs λοιπόν είναι κύτταρα που αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες. Έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εκτενώς και να διαφοροποιούνται *in vitro* υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, προς ποικίλους κυτταρικούς τύπους όπως οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Επιπλέον με κατάλληλη διέγερση έχει δειχθεί πως αυτά τα κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν μύες (Gang et al., 2004), ηπατοκύτταρα (Hong et al., 2005) και νευρικά κύτταρα (Jeong et al., 2004).

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).

Η ISCT προτείνει ένα σύνολο ελάχιστων κριτηρίων για την ταυτοποίηση οποιουδήποτε υπό διερεύνηση κυττάρου ως MSC (Dominici et al., 2006), τα οποία περιλαμβάνουν τα εξής :

- την ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται σε πλαστική ή γυάλινη επιφάνεια καλλιέργειας, χαρακτηριστικό που βοηθά στην απομόνωση τους·
- την έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας (CD90,CD105,CD73) και την απουσία έκφρασης των μορίων επιφανείας CD45, CD14,CD34,CD117 και CD31 (δείκτες αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων) (Fox et al., 2007)·
- και την ικανότητα τους για *in vitro* διαφοροποίηση σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης.

Τα σωματικά βλαστικά κύτταρα διατηρούν την συνέκφραση τουλάχιστον τριών εκ των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων των ESCs (Oct4, klf4 και Sox2) και παρουσιάζουν υψηλή έκφραση αλκαλικής φωσφατάσης. Επιπλέον τα οργανο-ειδικά βλαστικά κύτταρα εκφράζουν μια ομάδα χαρακτηριστικών μαρτύρων. Όπως στα εμβρυϊκά έτσι και στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα δεν υπάρχει σαφής έκφραση ενός χαρακτηριστικού παράγοντα, ωστόσο η παρουσία ενός ισορροπημένου δικτύου μεταξύ των βλαστικών δεικτών διατηρεί τα χαρακτηριστικά των ενήλικων βλαστικών κυττάρων (Alvarez et al., 2012). Επομένως τα MSCs διακρίνονται με βάση την έκφραση ενός συνόλου δεικτών χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην έκφραση αυτών σε MSCs προερχόμενα από διαφορετικές πηγές (Kolf et al., 2007).

Πιο συγκεκριμένα τα καλλιεργούμενα MSCs εκφράζουν τους μη ειδικούς δείκτες επιφανείας, CD44 (hyaluronan receptor), CD73 (ecto nucleotidase), CD90 (thy-1), CD105 (transforming growth factor-b receptor III),CD146 (melanoma-cell adhesion

molecule, MelCAM), ενώ αντίθετα δεν εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19 (Pittenger et al., 1999; Delorme et al., 2007; Deschaseaux et al. 2010). Επιπλέον, τα MSCs εκφράζουν χαμηλά επίπεδα αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC ή HLA) τάξης I, ενώ αντιγόνα τάξης II ανιχνεύονται μόνο μετά από βραχεία επώαση με ιντερφερόνη-γ (IFNγ)

Η κύρια πηγή MSCs είναι ο μυελός. Ωστόσο MSCs έχουν απομονωθεί και από άλλους ενήλικους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός (Banas et al., 2007; Yoshimura et al., 2009), το δέρμα (Bartsch et al., 2005), ο μυϊκός ιστός (Bruder et al., 1998), το περιόστεο (De Bari et al., 2001) και το περιφερικό αίμα (Villaron et al., 2004).

Το γεγονός πως MSCs, παρόμοια με αυτά του μυελού, έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί και από διάφορες άλλες πηγές, υποδεικνύει ότι ίσως να υπάρχει ένα δίκτυο μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που μεταναστεύει από την κύρια πηγή (το στρώμα του μυελού) στους διάφορους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και στη συνέχεια αποκτά κατάλληλα χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να συνεισφέρει στην διατήρηση και επιδιόρθωση του συγκεκριμένου ιστού (Tuan et al., 2003; Ferrari et al., 2007). Παρόλη την φαινοτυπική ομοιογένεια, τα κύτταρα αυτά μπορεί να παρουσιάζουν ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης, γεγονός που σχετίζεται με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται.

Αν και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους,εντούτοις αποτελούν μια υποσχόμενη πηγή για νέες κυτταρικές θεραπείες εξαιτίας της υψηλής πολλαπλασιαστικής και διαφοροποιητικής ικανότητας, της ιδιότητας δημιουργίας υποστηρικτικού μικροπεριβάλλοντος και της ανοσοτροποποιητικής τούς δράσης (Hilfiker et al., 2011).

Τα MSCs φαίνεται πως διαθέτουν μεταναστευτικές δυνατότητες, μπορούν να εκκρίνουν προστατευτικούς παράγοντες και έχουν κύριο ρόλο στην αναγέννηση του ιστού που έχει υποστεί κάποια βλάβη. Το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών εστιάζεται στο ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών και στην ικανότητά τους να δημιουργούν μικροπεριβάλλον και να υποστηρίζουν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μετά από ταυτόχρονη μεταμόσχευση, γεγονός που προσφέρει πολλές ευκαιρίες στη χρήση των MSCs για γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία (Hilfiker et al., 2011). Ωστόσο η χρήση των MSCs για θεραπευτικούς σκοπούς καθιστά αναγκαία τη δημιουργία μεγάλων αριθμητικά κυτταρικών αποθεμάτων και αυτό πραγματοποιείται μόνο μέσω χρονικά παρατεταμένων *in vitro* καλλιεργειών. Ας σημειωθεί ότι αν και τα MSCs βρίσκονται σε πολύ μικρούς αριθμούς *in vivo*, μπορούν εύκολα να εκπτυχθούν και να

πολλαπλασιαστούν *in vitro* δίνοντας διάφορους κυτταρικούς τύπους πέραν της μεσεγχυματικής προελεύσεως (Tormin et al., 2009). Παρόλα αυτά το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των MSCs είναι περιορισμένο και πολύ πιθανό η μακρόχρονη καλλιέργεια να οδηγήσει σε φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων. Σύγκριση MSCs από πρώιμα στάδια καλλιέργειας (μέχρι το 5^{ο} κυτταρικό πέρασμα) με μεταγενέστερα (μετά το 15^{ο}) έδειξαν πως τα κύτταρα έφεραν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με κυτταρική γήρανση. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της πολυδυναμικότητας και της διαφοροποιητικής τους ικανότητας (Oh J et al., 2014).

Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί πως καλλιεργούμενα MSCs μετά τη 12^{η} ανακαλλιέργεια εμφάνιζαν σημάδια γήρανσης και απώλεια ικανότητας λιπογενούς διαφοροποίησης (Kozhevnikova et al., 2008). Άλλες μελέτες έδειξαν πως σε καλλιέργειες ανθρώπινων MSCs τα κύτταρα διατηρούν το οστεογενετικό δυναμικό τους για δέκα ανακαλλιέργειες παρουσιάζοντας όμως σημάδια κυτταρικής γήρανσης, τα οποία μορφολογικά μεταφράζονταν σε ανομοιομορφία και αλλαγή στο σχήμα των κυττάρων, το κυτταρόπλασμα γινόταν κοκκιώδες και παρατηρούνταν κυτταρικά θραύσματα στο καλλιεργητικό μέσο (Stenderup et al., 2003).

Η κυτταρική γήρανση των MSCs, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή προέλευσης και τον οργανισμό. Μελέτες έχουν δείξει πως τα ανθρώπινα μυελικά MSCs είναι ανεκτικά σε 40-50 κυτταρικούς διπλασιασμούς (Baxter et al., 2004). Επιπλέον το δυναμικό πολλαπλασιασμού των MSCs μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας του δότη αλλά και με την πρόοδο των κυτταρικών περασμάτων *in vitro* (Kozhevnikova et al.,2008; Vilchez et al., 2014). Επιπροσθέτως η κυτταρική γήρανση επιφέρει λειτουργικές επιπτώσεις στην έκφραση των αντιγόνων επιφανείας αλλά και στη διαφοροποιητική ικανότητα προκαλώντας μόνιμες αλλαγές στη συνολική γονιδιακή έκφραση και στο προφίλ έκφρασης των miRNAs- των MSCs (Majumdar et al., 2000).

Αν και το δυναμικό διαφοροποίησης των MSCs είναι σχετικά περιορισμένο συγκριτικά με αυτό των ESCs και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, τα MSCs αποτελούν ασφαλέστερη πηγή κυτταρικής θεραπείας αναφορικά με τον κίνδυνο σχηματισμού όγκων και καρκινογένεσης κατά τη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, παρόλο που οι χαρακτηριστικές τους ιδιότητες (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίησης, ανοσορρύθμιση, ανασύσταση ιστών) φθίνουν με την αύξηση της ηλικίας του δότη. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να καθοριστούν μεθοδολογίες που να επιτρέπουν την παραγωγή μεγάλων αριθμών MSCs χωρίς να επηρεάζουν τις ιδιότητές τους καθόσον είναι επιθυμητή η εφαρμογή τους σε κυτταρικές θεραπείες (Yu et al., 2013).

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

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κύρια πηγή ενήλικων βλαστικών κυττάρων είναι ο μυελός . 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, 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. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα, δηλαδή ο πληθυσμός κυττάρων μη αιμοποιητικής προέλευσης, παρέχουν στρωματική υποστήριξη και κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων (Verfaillie, 2002; He et al., 2007), ενώ συγχρόνως δίνουν γένεση στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, στα κύτταρα του οστίτη ιστού και των μυών.

Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό (0,001-0,01%) του συνολικού πληθυσμού των εμπύρηνων κυττάρων στο μυελό (Pittenger et al.,1999; Zaim et al., 2012). Παρόλα αυτά μπορούν να απομονωθούν και να εκπτυχθούν ικανοποιητικά και στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν με τη χρήση κατάλληλων επαγωγικών μέσων, προς διάφορες κυτταρικές σειρές (Deans and Moseley, 2000). Τα ανθρώπινα MSCs απομονώνονται συνήθως από τη στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού, που προκύπτει μετά την επιστίβαση του μυελού σε φικόλη ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση (Colter et al., 2000). Τα μονοπύρηνα κύτταρα καλλιεργούνται στη συνέχεια σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και τα MSCs προσκολλώνται στην καλλιεργητική επιφάνεια. Στην καλλιεργητική επιφάνεια προσκολλώνται επίσης και κάποια αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία μετά από λίγο καιρό στην καλλιέργεια αποκολλώνται και απομένει σταδιακά μόνο ο πληθυσμός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. Τα MSCs πολλαπλασιάζονται ως ινοβλαστικά ατρακτοειδή κύτταρα, μάλιστα μετά από μια στατική φάση τα κύτταρα αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα με μια ταχύτητα ανάλογη της αρχικής τους πυκνότητας (Chamberlain et al., 2007). Τα MSCs μπορούν να επανακαλλιεργηθούν διαδοχικά για μέχρι περίπου 50 κυτταρικούς διπλασιασμούς (όριο Hayflick), εκτός και αν στο μέσο καλλιέργειας προστεθούν κυτταροκίνες ή αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων (Bianchi et al., 2003). Έχει προταθεί πως η προσθήκη του παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor -2 /FGF-2) παίζει σημαντικό ρόλο στην

απόκτηση μεγάλου αριθμού κυττάρων τα οποία διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης (Solchaga et al., 2005).

Μεγάλος αριθμός κλινικών δοκιμών έχει πραγματοποιηθεί που συγκρίνει διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες με σκοπό τον προσδιορισμό μιας ενιαίας προσέγγισης για την απομόνωση και την έκπτυξη των MSCs, αποσκοπώντας στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας κυττάρων με ταυτόχρονη διατήρηση των χαρακτηριστικών τους. Διαπιστώθηκε πως η ποιότητα του ορού εμβρύου βοός (FCS), το καλλιεργητικό μέσο, η συγκέντρωση της γλυκόζης, η γλουταμίνη, η συγκέντρωση των μονοπύρηνων κυττάρων στο μυελό, η συγκέντρωση των MSCs κατά την επανακαλλιέργεια καθώς και η ποιότητα των υλικών της καλλιεργητικής επιφάνειας μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα (Sotiropoulou et al., 2006).

Πέραν όμως των 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 J 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.

Συνοψίζοντας, 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.

3.1.3 Εξωεμβρυϊκά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί αποτελούν μια εναλλακτική πηγή MSCs. MSCs μπορούν να απομονωθούν από τον ομφάλιο λώρο, το αμνιακό υγρό, τις χοριακές λάχνες και τον πλακούντα. Πολλές μελέτες δείχνουν πως τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από αυτούς τους ιστούς έχουν χαρακτηριστικά των πολυδύναμων εμβρυϊκών κυττάρων αλλά και των πολυδύναμων ενήλικων βλαστικών κυττάρων (Bieback et al., 2010). Τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων και η απουσία ηθικών προβληματισμών για τις εφαρμογές τους καθιστά αυτά τα κύτταρα υποψήφια για κυτταρικές θεραπείες και αναγέννηση ιστών. Συγκριτικά με τα ενήλικα MSCs, οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί διαθέτουν χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα για κλινικές εφαρμογές, αναφορικά με το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και την προσβασιμότητά τους (Poloni 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.

MSCs έχουν εντοπιστεί τόσο στο ομφαλικό αίμα όσο και στους ιστούς του ομφαλίου λώρου. Ωστόσο η χαμηλή συχνότητα των MSCs στο ομφαλικό αίμα σε σχέση με το μυελό και η απουσία ενός ισχυρού πρωτόκολλου συλλογής και έκπτυξης τούς από μονάδες ομφαλιοπλακουντιακού αίματος έχουν παρεμποδίσει τη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές (Wexler et al., 2003; Perdikogianni et al., 2008). Αντιθέτως συνεχώς αυξανόμενα είναι τα δεδομένα που σχετίζονται με επιτυχή πρωτόκολλα απομόνωσης MSCs από τους ιστούς του ομφαλίου λώρου.

- ***Ο ομφάλιος λώρος είναι μια πλούσια πηγή MSCs***

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο και ο πλακούντας συνδέονται με έναν ελαστικό σωλήνα, τον ομφάλιο λώρο που προστατεύει τα υπάρχοντα αγγεία από την συμπίεση, την στρέψη και την κάμψη, εξασφαλίζοντας, παράλληλα, την καλή κυκλοφορία του αίματος. Ανατομικά, ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δύο αρτηρίες και μία φλέβα, ενσωματωμένα μέσα σε μία ειδική βλεννώδη μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, που είναι γνωστή ως γέλη του Wharton, και καλύπτεται εξωτερικά από αμνιακό επιθήλιο (Nanaev et al., 1997). Τα WJ-MSCs αναφέρονται και ως στρωματικά κύτταρα του ομφαλίου λώρου καθώς θεωρείται πως εγκλωβίζονται στη γέλη κατά την πρώιμη εμβρυογένεση στη διάρκεια της μετανάστευσης τους από την αορτο-γοναδική-μεσονεφρική περιοχή (aortic-gonadotropin-mesonephric region) προς το εμβρυϊκό ήπαρ μέσω του ομφαλίου λώρου (Wang XY et al., 2008).

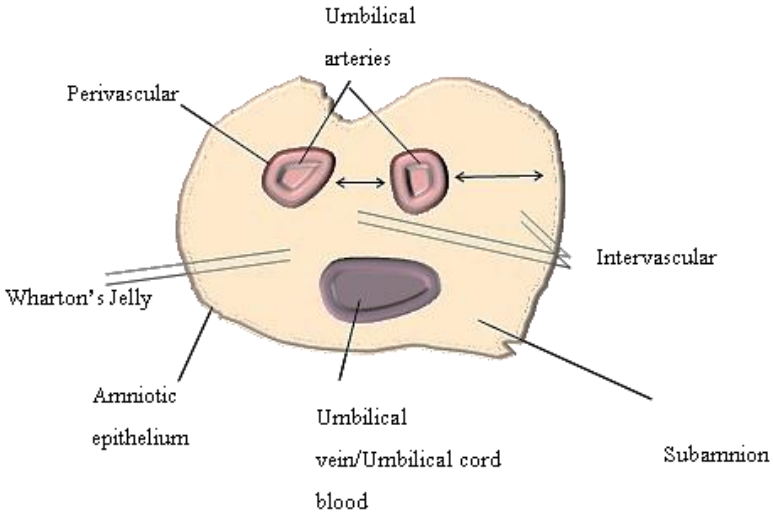
Παρόμοια με τα BM-MSCs, τα στρωματικά μεσεγχυματικά κύτταρα του ομφαλίου λώρου φέρουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που τα κατατάσσουν στην κατηγορία των MSCs. Αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται προσκολλημένα σε πλαστικές καλλιεργητικές επιφάνειες έχοντας το χαρακτηριστικό ατρακτόμορφο σχήμα του ινοβλάστη. Επίσης όπως και τα BM-MSCs φέρουν χαρακτηριστικά των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων, όπως η έκφραση δεικτών εμβρυϊκής προέλευσης, Oct4, Sox2, Nanog και Rex1 (Fong et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί ομφαλικά MSCs από τρεις περιοχές της γέλης του Wharton : την περιαγγειακή, την ενδοαγγειακή και τη περιοχή του υποάμνιου (Karahuseyinoglu et al., 2007) [***Εικόνα 1***]. Τα κύτταρα από αυτές τις ζώνες μοιράζονται τα χαρακτηριστικά του κλασσικού μεσεγχυματικού κυττάρου (ατρακτοειδές σχήμα, υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, πολυδυναμικότητα αναφορικά με τη

διαφοροποιητική ικανότητα). Αν και συγκριτική μελέτη των ιδιοτήτων των μεσεγχυματικών κυττάρων από τις τρεις διαφορετικές περιοχές που εντοπίζονται στη γέλη εκλείπει, εντούτοις μια μόνο μελέτη έδειξε πως τα περιαγγειακά MSCs αποτελούν έναν πιο αμιγή υποπληθυσμό κυττάρων όπου εκφράζεται έντονα η παν-κυτοκερατίνη (pancytokeratin). Αυτός ο πληθυσμός (κύτταρα τύπου 1), *in vitro* χαρακτηρίζεται από κύτταρα με επίπεδη/στρογγυλεμένη κυτταροπλασματική επιφάνεια, τα οποία τείνουν να μειώνονται στη διάρκεια της καλλιέργειας. Αντιθέτως τα ενδοαγγειακά και τα κύτταρα που προέρχονται από την υπο-αμνιακή περιοχή του ομφαλίου λώρου (κύτταρα τύπου 2), φέρουν το χαρακτηριστικό σχήμα του ινοβλάστη και παραμένουν στην καλλιέργεια (Karahuseyinoglu et al., 2007).

Ορισμένες ερευνητικές ομάδες απομόνωσαν MSCs από την περιαγγειακή ζώνη του ομφαλίου λώρου, τα οποία ονόμασαν Ομφαλικά Περιαγγειακά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Human Umbilical Cord Perivascular Cells - HUCPVCs). Τα HUCPVCs έχουν μικρότερο χρόνο διπλασιασμού συγκριτικά με τα άλλα ομφαλικά MSCs, σε πρώιμα και μεταγενέστερα κυτταρικά περάσματα (Karahuseyinoglu et al., 2007). Επιπλέον, τα HUCPVCs εμφανίζουν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα σε σχέση με τα ομόλογα μυελικά (Baksh et al., 2007).

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των HUCPVCs έχουν πολλές ομοιότητες με αυτό των MSCs από τη γέλη, ωστόσο διαφέρουν ως προς την έκφραση του CD146 δείκτη, ο οποίος εκφράζεται έντονα στα HUCPVCs, ενώ στα WJ-MSCs εκφράζεται ασθενώς ή εκλείπει. (Baksh et al., 2007; Moodley et al., 2009).



Εικόνα 1. *Ο ομφάλιος λώρος περιέχει δύο αρτηρίες και μια φλέβα, μέσα σε βλεννώδη ή ζελατινώδη συνδετικό ιστό, τη γέλη του Wharton, που περικλείεται από ένα απλό αμνιωτικό*

επιθήλιο. MSCs έχουν απομονωθεί από το ομφαλιοπλακουντιακό αίμα καθώς και από τις ενδοαγγειακές, περιαγγειακές και υπο-αμνιακές περιοχές της γέλης του Wharton.

- ***Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton (WJ-MSCs)***

Τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα της γέλης του Wharton's jelly (WJ-MSCs) μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να εκπτυχθούν σε μεγάλους αριθμούς και αντιπροσωπεύουν μια αξιόλογη πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων εναλλακτική του μυελού (Batsali et al., 2013). Πολλά πρωτόκολλα έχουν προταθεί για την απομόνωση των κυττάρων από τη γέλη, βασισμένα είτε στην απομάκρυνση των ομφαλικών αιμοφόρων αγγείων είτε μέσω ενζυμικής επεξεργασίας. Στην πρώτη περίπτωση, με απλούς και μηχανικούς χειρισμούς ο ιστός τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία μεταφέρονται σε τρυβλία καλλιέργειας με κατάλληλο καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο ώσπου τα κύτταρα να μεταναστεύσουν στην πλαστική επιφάνεια καλλιέργειας. Εναλλακτικά, η ενζυμική επεξεργασία με κολλαγενάση, θρυψίνη ή υαλουρονιδάση διαταράσσει τη δομή της κυτταρικής μήτρας απελευθερώνοντας τα κύτταρα, τα οποία μετά από πλύσιμο θα καλλιεργηθούν (Wang HS et al., 2004; La Rocca et al., 2009).

Το κύριο πλεονέκτημα της πρώτης μεθόδου είναι ότι η απουσία ενζυμικής επεξεργασίας ελαττώνει τις αρνητικές επιπτώσεις στις βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων ωστόσο φαίνεται πως οι αρχικές καλλιέργειες που λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο είναι κάπως ετερογενείς (Majore et al., 2011).

Ας σημειωθεί ότι ακόμα δεν έχει διερευνηθεί λεπτομερώς αν και κατά πόσο οι διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης των ομφαλικών MSCs επηρεάζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τούς. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως οι επιφανειακοί δείκτες των μεσεγχυματικών όπως CD73,CD90 και CD105 εμφανίζουν ποικίλο πρότυπο έκφρασης αναλόγως με τη μέθοδο απομόνωσης που εφαρμόστηκε (ενζυμική ή μηχανική έκπτυξη των κυττάρων). Μάλιστα η μέθοδος έκπτυξης των ομφαλικών μεσεγχυματικών κύτταρων φαίνεται να επηρεάζει και την έκφραση κάποιων εμβρυϊκών δεικτών όπως c-Kit και Oct-4 (Salehinejad et al., 2012).

3.2. Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των WJ-MSCs και BM-MSCs

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν υπάρχει ένας και μοναδικός επιφανειακός δείκτης που να χαρακτηρίζει τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Αντιθέτως 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 καλλιεργούμενα MSCs, εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα μια σειρά μη ειδικών επιφανειακών δεικτών, όπως, CD29, CD44 (hyaluronan receptor), CD51, CD73 (ecto nucleotidase), CD90 (thy-1), CD105 (transforming growth factor-b receptor III),CD146 (melanoma-cell adhesion molecule, MelCAM).

Η εξωκυττάρια πρωτεΐνη CD90 (Thy-1), μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που θεωρούνται MSCs, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων αλλά και μεταξύ των κυττάρων και του στρώματος, καθώς και στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση τους (Rege et al., 2006). Ο υποδοχέας του υαλουρονικού, CD44 ή HCAM (Homing cell adhesion molecule), συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση, την πρόσφυση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των βλαστικών κυττάρων. Επίσης φαίνεται να εμπλέκεται στη διατήρηση της βλαστικότητας συμβάλλοντας στην αλληλεπίδραση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων με την εκάστοτε φωλέα (niche) όπου γειτνιάζουν (Zhu et al., 2006).

Το CD105 (SH2/endoglin) και το CD37 (SH4) είναι δείκτες που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα επιφανείας των BM-MSCs (Haynesworth et al., 1992). Επιπλέον, το CD105 είναι μέλος του συμπλόκου των υποδοχέων του TGF-2 (Transforming growth factor-beta 2), το οποίο εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση. Μάλιστα $CD105^{+}$ - MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα (Masoud et al., 2014). Το CD146 ένας δείκτης των ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων, μεσολαβεί στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, στην αγγειογένεση αλλά και στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού (Masoud et al., 2014). Μάλιστα η έκφρασή του στα MSCs σχετίζεται και με την χωροταξική τους εντόπιση, δηλαδή φαίνεται να εκφράζεται εντονότερα στα MSCs που βρίσκονται εγγύτερα σε μια αγγειακή περιοχή.

Αντίθετα, τα MSCs δεν εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19 (Pittenger et al., 1999; Delorme et al., 2007; Deschaseaux et al. 2010). Επιπλέον, τα MSCs έχουν χαμηλή έκφραση αντιγόνων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I, ενώ αντιγόνα τάξης II ανιχνεύονται μόνο μετά από διέγερση, όπως με ιντερφερόνη-γ.

Τα περισσότερα δεδομένα αναφορικά με τα βιολογικά χαρακτηριστικά των BM-MSCs προέρχονται από *in vitro* μελέτες, που έχουν γίνει σε καλλιεργούμενα κύτταρα. Σχετικά περιορισμένα είναι τα δεδομένα που υπάρχουν αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των

πρωτογενών (native) MSCs (nMSCs), τα οποία δίνουν γένεση στα προσκολλώμενα στην καλλιεργητική φλάσκα κύτταρα. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην πολύ μικρή συχνότητα των nMSCs στα μυελικά δείγματα (1-10 ανά 10^5 εμπύρηνα κύτταρα του μυελού) (Pontikoglou et al., 2011; Frenette et al., 2013), καθώς επίσης και στην έλλειψη ειδικών δεικτών που να επιτρέπουν την απευθείας απομόνωσή τους από το μυελό. Παρ' όλα αυτά, με βάση τον ανοσοφαινότυπο των καλλιεργούμενων MSCs, διάφορα μεμβρανικά αντιγόνα έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον εμπλουτισμό σε μυελικά nMSCs. Μεταξύ των δεικτών αυτών, οι οποίοι εκφράζονται και στα ομφαλικά μεσεγχυματικά κύτταρα, περιλαμβάνονται το αντιγόνο Stro-1, το GD2 (ganglioside), το SSEA4 (stage-specific embryonic antigen), το CD49a, το CD166,το CD146, το CD200 και το CD271 (neural growth factor receptor). Το stro-1 είναι ένας επιφανειακός δείκτης, που εντοπίζεται σε όλα τα βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα και είναι συνυφασμένος με την πολυδυναμικότητα (Delorme et al., 2008; Pontikoglou et al., 2008; Pontikoglou et al., 2011). Χρησιμοποιώντας τους δείκτες αυτούς διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι τα MSCs *in vivo* εντοπίζονται περιαγγειακά και πιθανότατα ταυτίζονται με τα περικύτταρα (pericytes) ή προέρχονται από τα τελευταία. Τα περικύτταρα είναι κύτταρα που ευρίσκονται μακριά από τον αυλό του αγγείου, σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Shi et al., 2033; Pontikoglou et al., 2008; da Silva et al., 2009). Αυτή ακριβώς η *in vivo* εντόπιση των MSCs θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη δυνατότητα απομόνωσής τους από ποικίλα όργανα και ιστούς, όπως προαναφέρθηκε. Καθώς τα MSCs έχουν καταταχθεί στην κατηγορία των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, όπως είναι αναμενόμενο εκφράζουν και κάποιους δείκτες πολυδυναμικότητας όμοιους με αυτούς των ESCs, αλλά ίσως με διαφορετικό πρότυπο και ποσοστό έκφρασης ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους.

Επιπλέον τα ανθρώπινα ομφαλικά MSCs εκφράζουν τους εμβρυϊκούς δείκτες Oct-4, Nanog, Sox-2, c-Kit, Dnmt3b και Tert, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα ESCs (Fong et al., 2007; La Rocca et al 2009). Η χαμηλή έκφραση των παραπάνω δεικτών μπορεί να εξηγεί γιατί τα ομφαλικά MSCs δεν δημιουργούν τερατώματα *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Επιπλέον, εκφράζουν τους εμβρυϊκούς δείκτες Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1 και SSEA-4 (Weiss et al., 2006; Fong et al., 2007), πολλοί από τους οποίους διατηρούν την έκφραση τους και ύστερα από μακράς διάρκειας καλλιέργεια. Συγκριτικά με τα μυελικά MSCs, τα ομφαλικά εκφράζουν σε υψηλότερα ποσοστά τους δείκτες πολυδυναμίας Nanog, Dnmt3b, Gabrb3, Brix, Kit και Rex1 (Nekanti et al., 2010). Αν και δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί ο ρόλος των παραπάνω δεικτών στην βιολογία των ομφαλικών μεσεγχυματικών κυττάρων φαίνεται να αντανακλούν την πιο πρόδρομη φύση τους σε σχέση με τα μυελικά ομόλογά τους.

Ωστόσο, δεν εκφράζουν όλα τα ομφαλικά μεσεγχυματικά τους δείκτες πολυδυναμικοτητας στον ίδιο βαθμό, υποστηρίζοντας έτσι τον ετερογενή χαρακτήρα τους ανάλογα με το σημείο του ομφαλίου λώρου από το οποίο προήλθαν. Επιπλέον, τα ομφαλικά μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν εντονότερα, σε σχέση με τα μυελικά, γονίδια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης/ απόπτωσης της κινάσης της φωσφοϊνοσιτόλης [(PI3K)-AKT survival/proliferation pathway], ενώ φαίνεται να έχουν πιο ενεργοποιημένο το μονοπάτι του NFκ-B. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με μια παρατήρηση πως τα ανθρώπινα WJ-MSCs εκφράζουν τον αρχέγονο δείκτη βλαστικότητας, TERT, ίσως να δικαιολογεί εν μέρει τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού των ομφαλικών MSCs (Karahuseyinoglu et al., 2007) και την εντονότερη ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται *ex vivo* (Troyer et al., 2008) σε σχέση με τα μυελικά.

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

Όπως αναφέρθηκε, τα διάφορα είδη MSCs, συμπεριλαμβανομένων των μυελικών και των ομφαλικών, θα πρέπει να διαφοροποιούνται τουλάχιστον προς τις τρεις κυτταρικές σειρές μεσοδερμικής προέλευσης, δηλαδή προς οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, παρά την ύπαρξη κάποιων αντιπαραθέσεων. Συγκεκριμένα, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει την απουσία δυναμικού διαφοροποίησης των MSCs από τον ομφάλιο λώρο, ενώ κάποιες άλλες αποδεικνύουν το αντίθετο, δηλαδή την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται προς τις τρεις κυτταρικές σειρές μεσοδερμικής προέλευσης. Επιπλέον λίγα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με το αν υπάρχει διαφορά στο δυναμικό διαφοροποίησης μεταξύ των μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από ολόκληρο τον ομφάλιο λώρο ή μόνο από τη γέλη του Wharton (Hoffmann et al., 2017).

Ωστόσο, συνολικά,αυξανόμενα είναι τα 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; Huang et al., 2012) όπως αναμένεται σύμφωνα με τα κριτήρια της ISCT για τα MSCs (Dominici et al.,2006). 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 (Lui J et al., 2004).

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 II ή X για τα χονδροκύτταρα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε το δυναμικό διαφοροποίησης των MSCs προς οποιαδήποτε κυτταρική σειρά, φαίνεται να εξαρτάται από την πηγή προέλευσης των κυττάρων. Έτσι, ο σχηματισμός λιπιδικών κυστιδίων κατά τη διαφοροποίση των ομφαλικών MSCs φαίνεται να απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μάλιστα τα σχηματιζόμενα λιποκύτταρα είναι λιγότερο ώριμα σε σχέση με τα αντίστοιχα των μυελικών MSCs (Karahuseyinoglu et al., 2007; Hsieh et al., 2010). Επιπλέον, έχει φανεί πως τα ομφαλικά MSCs υστερούν ως προς τη διαφοροποίση τους προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα μυελικά ομόλογά τους (Karahuseyinoglu et al., 2007; Hsieh et al., 2010; Cavallo et al., 2011).

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, με τα ομφαλικά να εμφανίζουν υψηλότερο δυναμικό ενδοθηλιακής διαφοροποίησης σε σχέση με τα μυελικά MSCs (Chen et al., 2009). Μια μελέτη προτείνει πως τα ομφαλικά MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά σκελετικά κύτταρα, ενώ έντονη αντιπαράθεση υπάρχει για την ικανότητα διαφοροποίησης τους προς καρδιακά μυοκύτταρα. Επίσης μελέτες έχουν δείξει πως τα ομφαλικά κύτταρα, με κατάλληλη διέγερση, φέρουν χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων. Μάλιστα υποστηρίζεται πως τα ομφαλικά MSCs είναι πιο «προετοιμασμένα» να διαφοροποιηθούν προς νευρικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα μυελικά, διότι κατά την αδιαφοροποίητη κατάστασή τους εκφράζουν γονίδια που σχετίζονται με τη νευρική κυτταρική σειρά. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα ομφαλικά MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς τον ενδοδερμικό κυτταρικό άξονα, καθώς φάνηκε πως στην αδιαφοροποιήτη 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. Οι ανοσολογικές ιδιότητες των MSCs

Τα MSCs λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους βρίσκονται ανάμεσα στους υποψήφιους κυτταρικούς πληθυσμούς για χρήση στην αναγεννητική ιατρική. Ιδανικα, τα κύτταρα που θα χρησιμοποιούνται για κυτταρικές θεραπείες θα πρέπει να είναι ανοσολογικά «αδρανή». Τα MSCs φαίνεται να πληρούν αυτή την προϋπόθεση καθώς έχουν την ιδιότητα να διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης και να αναστέλλουν διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος (Pontikoglou et al., 2011).

Όπως αναφέρθηκε, τα MSCs εκφράζουν ελάχιστα έως καθόλου αντιγονικά μόρια HLA I και II, ενώ δεν εμφανίζουν καμιά έκφραση συν-διεγερτικών (co-stimulatory) μορίων όπως B7-1, B7-2 και CD40 (Pontikoglou et al., 2011). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η ανοσοκατασταλτική δράση των MSCs ίσως να προϋποθέτει ενεργοποίηση με προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως IFN-γ, η οποία μπορεί να επάγει την έκφραση HLA τάξης II στην επιφάνεια των MSCs. Μάλιστα τα ομφαλικά MSCs, εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του ενδοκυττάριου ανοσοκατασταλτικού μορίου HLA-G, συγκριτικά με τα μυελικά MSCs (Deuse et al., 2011). Ωστόσο οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ανοσοκαταστολή από τα MSCs δεν είναι ξεκάθαροι. *In vitro* μελέτες έδειξαν πως τα MSCs προάγουν τις ανοσοτροποποιητικές τους δράσεις μέσω της αλληλεπίδρασής τους με κύτταρα της φυσικής ανοσίας (δενδριτικά κύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς/NK) όσο και με κύτταρα Τ και Β, της επίκτητης ανοσίας. Φαίνεται λοιπόν πως *in vitro* τα MSCs αναστέλλουν την έκπτυξη, τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των ώριμων δενδριτικών κυττάρων, ενώ ελαττώνουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα NK κύτταρα (Siegel et al., 2009). Τα MSCs είναι σε θέση να αναστείλουν την ενεργοποίηση των Β κυττάρων και την επαγωγή των Τ. Σχετικά με τα δεύτερα, έχει φανεί πως τα MSCs αναχαιτίζουν τα Τ λεμφοκύτταρα στη φάση G0-G1, του κυτταρικού κύκλου, μέσω αναστολής της κυκλίνης D2, ενώ αυξάνουν το ποσοστό των Τ ρυθμιστικών κυττάρων (Siegel et al., 2009; Pontikoglou et al., 2011). Μάλιστα τα ομφαλικά MSCs εμφανίζουν εντονότερη ανοσοκατασταλτική δράση έναντι των μυελικών (Najar et al., 2010). Για αυτές τις δράσεις των MSCs απαιτείται τόσο διακυτταρική επαφή όσο και έκκριση διαλυτών παραγόντων από τα MSCs, όπως TGF-β1, HGF (hepatocyte growth factor), IDO

(indoleamine 2,3-dioxygenase), PGE2 (prostaglandin 2) (Siegel et al., 2009; Pontikoglou et al., 2011).

Συνολικά οι *in vitro* μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως τα MSCs είναι σε θέση να διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης και συνήθως ασκούν ανοσοτροποποιητική ή αντιφλεγμονώδη δράση. Αυτές οι ιδιότητες τα καθιστούν υποσχόμενα «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) (Le Blanc et al., 2006).

Συμπερασματικά λοιπόν η εκτενής ικανότητα του *in vitro* πολλαπλασιασμού και η ικανότητά διαφοροποίησης προς διάφορους τύπους κυττάρων, σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες ανοσορυθμιστικές ιδιότητες καθιστούν τα MSCs πολύτιμο εργαλείο για ιστική επιδιόρθωση. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μια σειρά μελετών, στις οποίες έχει περιγραφεί επιτυχής ενσωμάτωση (engraftment) των MSCs σε διάφορους ιστούς ύστερα από τοπική έγχυσή τους, ιδιαίτερα δε σε έδαφος ιστικής βλάβης (Chamberlain et al., 2007). Ωστόσο, η μετανάστευση (homing), η ενσωμάτωση - είτε πρόκειται για πραγματική τοιαύτη είτε για σύντηξη με τα κύτταρα του ιστού - αλλά και η διαφοροποίηση των MSCs εντός του νοσούντος ιστού είναι ως επί το πλείστον πολύ περιορισμένες, για να θεωρηθεί ότι ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την παρατηρούμενη ιστική αναγέννηση (Chamberlain et al., 2007; da Silva et al., 2009). Έτσι, πολλές ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν ότι τα ευεργετικά θεραπευτικά αποτελέσματα των MSCs θα πρέπει να αποδίδονται, κατά κύριο λόγο, σε παρακρινείς δράσεις των κυττάρων, μέσω έκκρισης βιοδραστικών παραγόντων με αυξητικές, αντιφλεγμονώδεις ή/και ανοσοκατασταλτικές, αγγειογενετικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες (Chamberlain et al., 2007; da Silva et al., 2009).

3.5. Η ικανότητα των MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση

Η αιμοποίηση συντηρείται από μια μικρή δεξαμενή HSCs οι βασικές ιδιότητες των οποίων είναι: η ικανότητα αυτοανανέωσης ώστε να διατηρούν σταθερό τον αριθμό τους, η πολυδυναμικότητα παράγοντας απογόνους που ανήκουν σε όλες τις αιμοποιητικές σειρές, και η δυνατότητα να διαφοροποιούνται προς πιο ώριμα κύτταρα (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Κατά την εμβρυϊκή ζωή, το ήπαρ και ο σπλήνας είναι τα κύρια αιμοποιητικά όργανα, ενώ από τα τελικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου και σε όλη τη διάρκεια της

ενήλικης ζωής ο μυελός αποτελεί υπό φυσιολογικές συνθήκες το μόνο όργανο της αιμοποίησης.

Μέσα στο μυελό, η αιμοποίηση είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των αιμοποιητικών και στρωματικών κυττάρων (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια μελέτες σε μοντέλα ποντικών έδειξαν πως τα MSCs συμβάλλουν στη δημιουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του μυελού και αποτελούν πηγή κυττάρων που παράγουν τα κύτταρα του «μυελικού στρώματος» (λιποκύτταρα, οστεοβλάστες και δικτυοκύτταρα). Ειδικές περιοχές εντός του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, αναφερόμενες ως «φωλιές» έχει προταθεί πως διατηρούν τα HSCs σε κατάσταση «ηρεμίας» (quiescence). Οι «φωλιές» προστατεύουν την ακεραιότητα και τη διατήρηση των λειτουργιών των HSCs (Boulais et al., 2015), ενώ φαίνεται να εμπλέκονται στην αυτοανανέωση και τη διαφοροποίησή τους (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Πιο συγκεκριμένα το 1978, ο Scofield διατύπωσε τη θεωρία των «αιμοποιητικών φωλιών» (“niche” hypothesis) η οποία πρεσβεύει πως τα HSCs απαιτούν την υποστήριξη και άλλων κυττάρων μέσα στο μυελό ώστε να διατηρήσουν τη βλαστικότητα τους (stemness). Επιπρόσθετα, οι αιμοποιητικές φωλιές διασφαλίζουν την αιμοποιητική ομοιόσταση και επιπλέον ρυθμίζουν την ανταπόκριση των HSCs σε εξωγενή ερεθίσματα.

Έχουν προταθεί τρία είδη αιμοποιητικών «φωλιών» : α) η οστεοβλαστική ή ενδοοστική φωλιά (osteoblastic or endosteal niche - στην επιφάνεια των ενδοοστικών δοκίδων) όπου τα HSCs βρίσκονται σε κατάσταση «ηρεμίας», β) η ενδοθηλιακή ή αγγειακή φωλιά (endothelial or vascular niche – πλησίον των περιαγγειακών κολποειδών) όπου εντοπίζονται HSCs σε κατάσταση πολλαπλασιασμού, και γ) η δικτυοκυτταρική (reticular niche) όπου τα HSCs συντηρούνται και επιβιώνουν μέσω άμεσων κυτταρικών επαφών με τα δικτυοκύτταρα (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Ωστόσο δεν είναι πλήρως αποδεκτή η πραγματική ύπαρξη των διαφορετικών φωλιών, καθώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί που φαίνεται να εντοπίζονται σε καθεμιά από τις παραπάνω, βρίσκονται πολύ κοντά ο ένας με τον άλλον χωρίς να οριοθετούνται πραγματικά.

Πιο συγκεκριμένα στα ποντίκια εντοπίζονται δυο διαφορετικοί περιαγγειακοί πληθυσμοί μεσεγχυματικών κυττάρων, τα CARs (CXCL12 abundant reticular cells), που εκφράζουν υψηλά επίπεδα CXCL12 (CXC motif ligand 12), μιας χημειοκίνης απαραίτητης για τη μετανάστευση (homing) και τη διατήρηση (maintenance) των HSCS, και τα $NESTIN^+$ - κύτταρα που φαίνεται να έχουν οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό. Μάλιστα σε μοντέλα ποντικών φαίνεται πως τα $NESTIN^+$ - GFP^+ κύτταρα

συμμετέχουν στη μετανάστευση και στη διατήρηση (retention) των HSCs στο μυελό (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Επιπλέον τα CAR κύτταρα παράγουν σημαντικά επίπεδα του SCF συμβάλλοντας στη συντήρηση του αριθμού των προγονικών ερυθροκυττάρων και των Β κυττάρων, καθώς και στη διατήρηση των HSCs σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Τα περισσότερα CAR κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα και οστεοβλάστες και έτσι θεωρείται πως συνιστούν έναν υποπληθυσμό των MSCs.

Στον ανθρώπινο μυελό ταυτοποιήθηκε από τους Saccheti et al., ο MSC υποπληθυσμός των $CD146^+$ κυττάρων (melanoma cell adhesionmolecule, MCAM). Τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται σε υπο-ενδοθηλιακή (subendothelial) περιοχή στα τοιχώματα των αγγειακών κολποειδών και αντιπροσωπεύουν το 0,11% των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων.

Τα CD146+ κύτταρα εκφράζουν επιπλέον CD105, αλκαλική φωσφατάση και υψηλά επίπεδα Jagged-1, N-cadherin, CXCL12 και SCF (Stem Cell Factor). Μάλιστα όταν ανθρώπινα $CD146^+$ MSCs μεταμοσχεύονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια δημιουργούν οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα παράλληλα δε, παρατηρείται και αιμοποιητική δραστηριότητα. Εξαιτίας λοιπόν της πολυδύναμης φύσης τούς, του χωροταξικού εντοπισμού τους και της ικανότητας τους να επάγουν αιμοποίηση, προτείνεται πως τα ανθρώπινα CD146+ MSCs αντιστοιχούν στα CAR κύτταρα των ποντικιών (Sacchetti et al., 2007).

Πλήθος ερευνών αναφέρουν ότι τα MSCs εκφράζουν ποικίλα μόρια που συμβάλλουν στη ρύθμιση της αιμοποίησης. Αυτά τα μόρια συμμετέχουν σε πολλές διακριτές διαδικασίες ρυθμίζοντας την μετανάστευση (homing), την πρόσδεση, τη διατήρηση/συντήρηση (maintenance), την κατάσταση ηρεμίας (quiescence), την αυτό-ανανέωση και τον πολλαπλασιασμό των HSCs (Fajardo-Orduña et al., 2015).

Ανάμεσα στους ποικίλους διαλυτούς παράγοντες που εκκρίνουν τα MSCs και οι οποίοι είναι επαρκείς για να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων, περιλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες, χημειοκίνες και κυτταροκίνες όπως ο TNF-α (tumor necrosis factor-alpha), ο TGF-β1 , ο LIF (leukemia inhibitory factor) και οι CXCL12, SCF, M-CSF, IL-3, IL-6, TPO, FLT-3 ligand (Wagner et al., 2007).

Μάλιστα όταν τα επίπεδα του CXCL12 σε συστήματα συγκαλλιεργειών MSCs και CD34+ είναι αυξημένα παρατηρείται μείωση των κυτταροκινών και χημειοκινών που επάγουν τη διαφοροποίηση των HSCs έναντι της αυτοανανέωσής τους (Mishima et al., 2010).

Από την άλλη πλευρά η παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα MSCs, όπως ο SDF-1α, φαίνεται να επάγει τη μετανάστευση και την παραγωγή HSCs (Lo Iacono M et al., 2017).

Στη ρύθμιση της αιμοποιητικής φωλιάς συμμετέχουν επιπλέον και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Μεταξύ αυτών είναι: η tenascin, που δρα μέσω σύνδεσης με την integrin-9, ο υποδοχέας ROBO4 και ο προσδέτης του Slit2. Παράλληλα,στη διαμόρφωση της αιμοποιητικής φωλιάς φαίνεται να εμπλέκονται η osteopontin και μόρια Wnt που συμμετέχουν στο μη-κανονικό μονοπάτι (Nakamura-Ishizu et al., 2012; Sugimura et al.,2012)..

Συνοψίζοντας, οι παραπάνω παρατηρήσεις παρέχουν το θεωρητικό υπόβαθρο ώστε να διερευνηθεί η χρήση των MSCs για τον *ex vivo* πολλαπλασιασμό (expansion) των HSCs. Πράγματι, υπαρχουν πειραματικά μοντέλα συγκαλλιέργειας HSCs μυελού ή ομφαλιοπλακουντιακού με υποστρώματα μυελικών MSCs σε θρεπτικό μέσο που περιέχει FBS και ποικίλους συνδυασμούς αυξητικών παραγόντων όπως G-CSF, SCF, TPO (thrombopoietin), Flt-3 ligand ή fibroblast growth factor – 1 (FGF-1). Τα μοντέλα αυτά έχουν αποδείξει την αύξηση του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC-total nucleated cells), των κλωνογονικών ή των CD34+ κυττάρων (Tung et al., 2010) παρουσία μυελικών MSCs . Μάλιστα, σε ζωικά μοντέλα, κυρίως ποντικών, έχει αποδειχτεί ότι η ενσωμάτωση (engraftment) των ομφαλικών HSCs ενισχύεται όταν συγ-χορηγούνται με μυελικά MSCs σε σύγκριση με την έγχυση μόνο των HSCs (Lo Lacono M et al., 2017).

Τα πολύ υποσχόμενα δεδομένα της *ex vivo* ικανότητας των μυελικών MSCs να επάγουν την παραγωγή HSCs, σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα ομφαλικά MSCs μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά με τα αντίστοιχα μυελικά MSCs, αλλά υπερέχουν ως προς την ευκολία πρόσβασης, την ανώδυνη και αποτελεσματική απομόνωσή και ανάπτυξή τους καθιστούν τα ομφαλικά MSCs ελκυστικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των HSCs.

Το 2007 δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη που υποδείκνυε πως όπως τα μυελικά MSCs έτσι και τα ομφαλικά MSCs μπορούν να υποστηρίξουν την αιμοποίηση (Friedman et al., 2007).

Μάλιστα σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα ομφαλικά MSCs εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες κυτταροκινών και αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων συγκριτικά με τα μυελικά, συμπεριλαμβανομένων των G-CSF,GM-CSF,LIF, IL-1α, IL-6,IL-8, IL-11. Επιπλέον συγκαλλιέργεια των ομφαλικών MSCs με ομφαλικά -CD34+ κύτταρα οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των αιμοποιητικών αποικιών (Colony Forming

Units, CFUs) σε αντίθεση με τον αριθμό των CFUs που αναπτύσσονται απουσία του μεσεγχυματικού υποστρώματος (Friedman et al., 2007).

Υπάρχει λοιπόν ομοφωνία μεταξύ των ποικίλων βιβλιογραφικών αναφορών που υποδεικνύουν πως η ταυτόχρονη έγχυση /μεταμόσχευση των μυελικών MSCs και HSCs επιταχύνει την ενσωμάτωση των τελευταίων, και πως η ταυτόχρονη έγχυση ομφαλικών MSCs με ομφαλοπλακουντιακό αίμα ή CD34+ κύτταρα σε NOD/SCID ποντίκια επιταχύνουν την ανασύσταση των ανθρώπινων αιμοποιητικών κυττάρων.

Συγκριτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με MSCs από άλλες περιγεννετικές (perinatal) πηγές πέραν του μυελού και του ομφαλίου λώρου, συμπεριλαμβανομένων του αμνιακού υγρού, του χορίου, του άμνιου και του ομφαλικού αίματος, έδειξαν πως τα MSCs, από τις διαφορετικές πηγές, ως υποστηρικτικά υποστρώματα έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τον αριθμό των CD34+ κυττάρων σε συστήματα συγκαλλιεργειών. Ωστόσο ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των CD34+ φαίνεται να επηρεάζεται από την πηγή προέλευσης του MSC-υποστρώματος. Συγκεκριμένα, ο πολλαπλασιασμός των CD34+ είναι πιο αποτελεσματικός όταν συγκαλλιεργούνται με BM-MSCs και το αμνιακό υγρό σε σχέση με τα MSCs από το άμνιο, το χόριο ή τη γέλη του Wharton (Batsali et al., 2013).

Καταλήγοντας είναι πλέον σαφές πως τα MSCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον του μυελού ρυθμίζοντας την αιμοποίηση. Η ταυτόχρονη έγχυση των HSCs με BM-MSCs, φαίνεται να εξασφαλίζει την απαιτούμενη ανοσολογική ανοχή, επιταχύνοντας την ανασύσταση του κατεστραμμένου μυελικού στρώματος μέσω διαφόρων ουσιών που επάγουν και ενισχύουν τη μετανάστευση (homing) και την ενσωμάτωση (engraftment) των HSCs. Ωστόσο η χρήση των MSCs από νεογνικούς ιστούς, όπως ο ομφάλιος λώρος, φαίνεται να εγείρει περισσότερο το κλινικό ενδιαφέρον σε σχέση με τα μυελικά MSCs, λόγω της εύκολης, ανώδυνης και χωρίς ηθικούς προβληματισμούς πρόσβασης στην πηγή. Οι ανατομικές διαφορές μεταξύ της μυελικής αιμοποιητικής φωλιάς και του ομφαλίου λώρου, απαιτούν εκτενή μελέτη ώστε να διερευνηθούν και να χαρακτηριστούν οι βιολογικές ιδιότητες των ομφαλικών MSCs *in vivo*. Η πλήρης γνώση των παραγόντων και των μονοπατιών που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των HSCs *in vitro*, θα καθιερώσουν τα βέλτιστα πρωτόκολλα για τη χρήση αυτών των κυττάρων σε υπάρχουσες κλινικές εφαρμογές (Batsali et al., 2013).

Καταλήγοντας, τα πολυδύναμα MSCs μπορούν να απομονωθούν και να πολλαπλασιαστούν *in vitro*. Η εύκολη απομόνωση τους από ποικίλες πηγές (μυελός , ομφάλιος λώρος, λιπώδης ιστός, οδοντικός πολφός), η έλλειψη ανοσογονικότητας και ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης τούς σε ποικίλες κυτταρικές σειρές

πέραν της μεσοδερμικής προέλευσης, καθιστούν τα MSCs κατάλληλα εργαλεία για εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής και κυτταρικές θεραπείες.

3.6. Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι

Η διερεύνηση και η κατανόηση σε μοριακό επίπεδο των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν τα προαναφερθέντα βιολογικά χαρακτηριστικά των MSCs αποτελεί επιτακτική ανάγκη προκειμένου να καθιερωθούν πρωτόκολλα για κλινική χρήση (Ling et al., 2009).

Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι, μεταξύ άλλων, αποτελεί ένα ρυθμιστή «κλειδί», καθώς η δράση του επηρεάζει και καθορίζει τη μοίρα των MSCs. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt είναι εξελικτικά διατηρημένο από το νηματοειδή ως τα θηλαστικά, ρυθμίζοντας ποικίλα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και την ομοιόσταση των ιστών στην ενήλικη ζωή (Cadigan & Nusse 1997, Wadarz & Nusse 1998).

Η Wnt σηματοδότηση επηρεάζει πολλές και σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η απόπτωση, η αγγειογένεση και η πολικότητα του κυττάρου (cell polarity). Επίσης φαίνεται πως εμπλέκεται στη ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων στους ενήλικους ιστούς, καθώς και στη ρύθμιση αναγεννητικών διαδικασιών μετά από ασθένεια, τραυματισμό ή γήρανση.

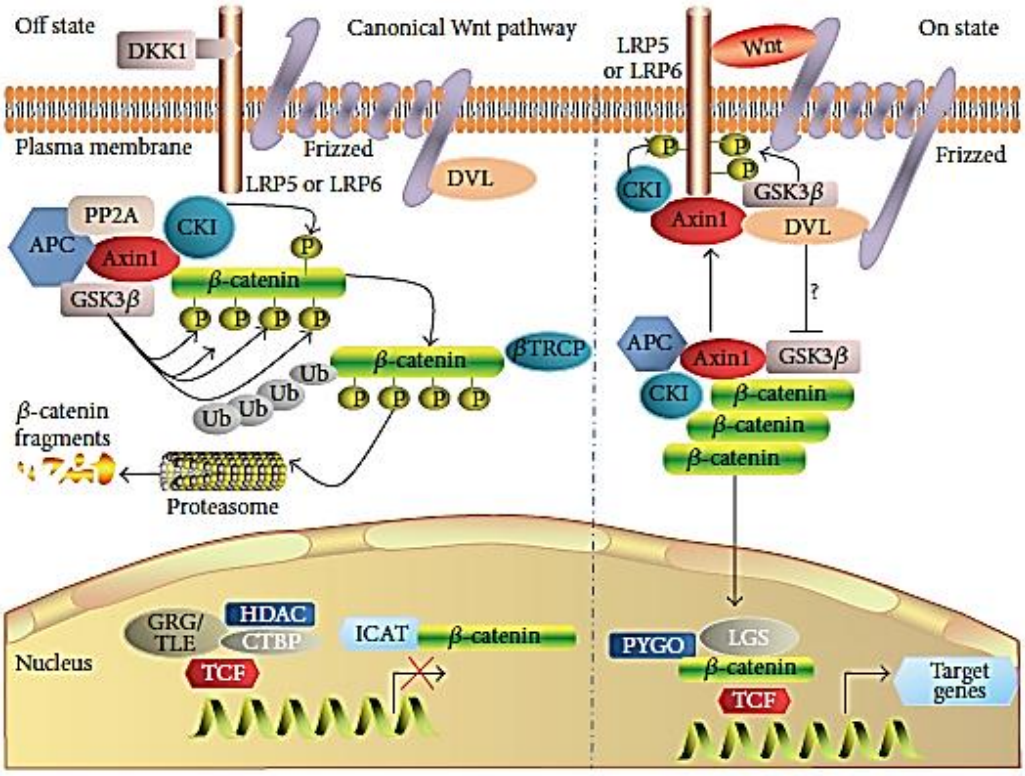
Τα Wnt μόρια είναι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες 350-400 αμινοξικών καταλοίπων (residuals), εκ των οποίων 23-24 είναι υψηλά συντηρημένα κυστεϊνικά κατάλοιπα (μοριακό βάρος : 39-46kDa) (Cadigan & Nusse, 1997).

Ανάλογα με την ενδοκυττάρια απόκριση που προκαλεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt διακρίνεται σε κανονικό και μη-κανονικό μονοπάτι.

Η β-κατενίνη (β-catenin) αποτελεί το κύριο σηματοδοτικό μόριο του κανονικού μονοπατιού, ενώ στο μη-κανονικό μονοπάτι συμπεριλαμβάνονται η πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C/ PKC) και η c-jun αμινοτετελική κινάση (c-jun N-terminal kinase) (Visweswaran et al., 2015).

3.6.1. Κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

Το κανονικό Wnt μονοπάτι εξαρτάται από τη β-κατενίνη. Οι προσδέτες του Wnt δημιουργούν ένα τριαδικό σύμπλοκο με τον υποδοχέα Frizzled (Fz) και τον συν-υποδοχέα LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6), ενεργοποιώντας την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη Dishevelled (Dvl). Η Dvl, στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β), μια πρωτεΐνη του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης. Το σύμπλοκο καταστροφής αποτελείται από τις πρωτεΐνες: axin, adenomatouw polyposis coli (APC), casein kinase 1α (CK1α) και την GSK-3β, και είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση και αποδόμηση της β-κατενίνης όταν απουσιάζουν οι προσδέτες του Wnt. Στην περίπτωση που το σύμπλοκο είναι ανενεργό, η αποφωσφορυλιωμένη β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία μεταφέρεται στον πυρήνα. Με τη σειρά της η β-κατενίνη όταν βρεθεί στον πυρήνα, αφού αντικαταστήσει τους συν-καταστολείς (co-repressors) προσδένεται στο μεταγραφικό σύμπλοκο TCF/LEF (T cell factor / Lymphoid enhancer factor) επάγοντας την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του Wnt (Visweswaran et al., 2015) ***[Εικόνα 2]***.



Shi J, et al., J Immunol Res, 2016

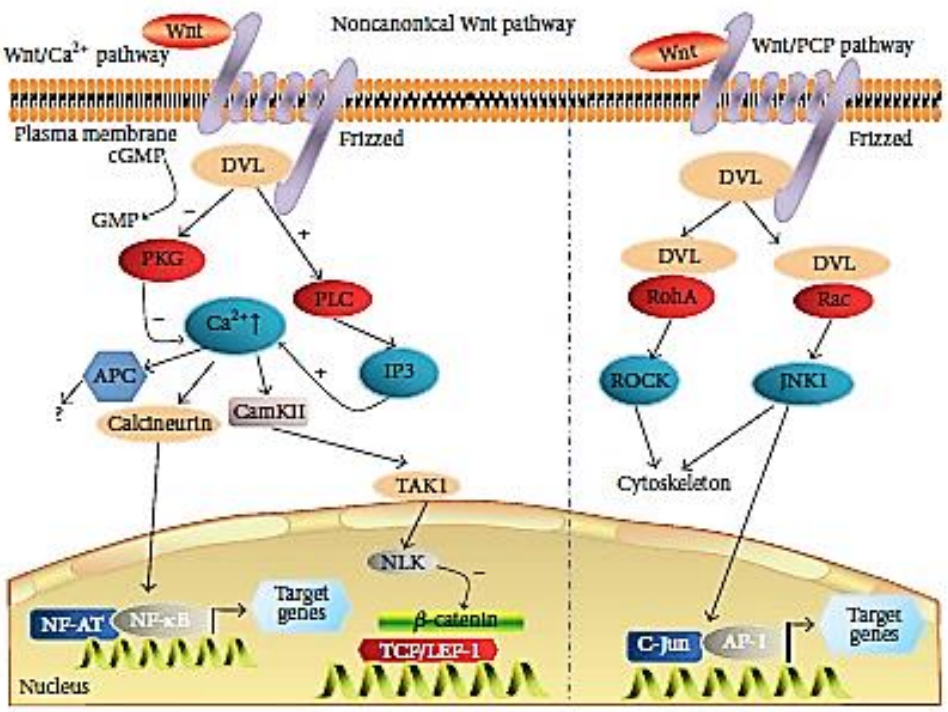
Εικόνα 2. *Το κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι απουσία των Wnt προσδετών (**αριστερά**). Απουσία των Wnt προσδετών η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη αποικοδομείται μέσω*

*φωσφορυλίωσης από το πολύπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούμενο από την πρωτεΐνη της αξίνης Axin, την πρωτεϊνη της αδενωματώδους πολυποδίασης adenomatous polyposis coli (APC), την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου glycogen synthase kinase 3β (GSK3β), και την κινάση της καζεϊνης casein kinase 1α (CK1α). Η φωσφορυλιωμένη μορφή της β-κατενίνης αναγνωρίζεται από μια λιγάση, την E3 ουμπικιτίνη (E3 ubiquitin ligase / β-TrCP) και αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Το κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι παρουσία των Wnt προσδετών (**δεξιά**). Οι Wnt προσδέτες προσδένονται στους FZD και LPR υποδοχείς, ενεργοποιώντας την σηματοδότηση και μέσω διέγερσης της Dishevelled πρωτεϊνης (Dvl). Η ενεργοποίηση της Dvl οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του GSK3β και οδηγεί στην κυτταροπλασματική συσσώρευση της β-κατενίνης. Κατά συνέπεια η ενεργός β-κατενίνη εισέρχεται στον πυρήνα, δεσμεύεται στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας του παράγοντα των Τ-κυττάρων (TCF)-πρωτεϊνης δέσμευσης στους λεμφογενείς ενισχυτές (LEF) και ενεργοποιεί γονίδια στόχους που αποκρίνονται στο Wnt.*

3.6.2. Μη – κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

Το μη κανονικό Wnt μονοπάτι είναι ανεξάρτητο της β-κατενίνης και εμπεριέχει ποικίλα διακριτά μονοπάτια. Ένα από τα μη-κανονικά μονοπάτια, το «Wnt/Ca^{2+} σηματοδοτικό μονοπάτι», επιδρά στην κυτταρική μετανάστευση ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση της CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C/PKC), με ακόλουθη απελευθέρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου (Komiya Y et al., 2008). Ένα δεύτερο μη-κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι το «Wnt/planar cell polarity (PCP) σηματοδοτικό μονοπάτι», φαίνεται πως ελέγχει την οργάνωση του κυτταροσκελετού και της πολικότητας των κυττάρων, και δρα ενεργοποιώντας τις Rho-GTPases and Jun N-terminal kinases (JNKs) (Komiya Y et al., 2008). Τα μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν στα προαναφερθέντα μη-κανονικά μονοπάτια έχουν μελετηθεί λιγότερο συγκριτικά με το κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι ***[Εικόνα 3]***.

Μεταξύ των ποικίλων μορίων που ρυθμίζουν το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνονται εξωκυτταρικοί Wnt αγωνιστές όπως, οι εκκρινόμενες Frizzled-related πρωτεΐνες (sFRPs), οι παράγοντες Dickkopfs (Dkks) και ο Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) (Kawano Y et al., 2003, Gonsalves FC et al., 2011). Πέραν ωστόσο των παραπάνω φυσικών εξωκυτταρικών Wnt ανταγωνιστών υπάρχουν και φαρμακολογικοί ανταγωνιστές όπως ο XAV939 και το iCRT3 (Jones SE et al., 2002, Boutin E et al., 2013).



Shi J, et al., J Immunol Res, 2016

Εικόνα 3. *Τα μη-κανονικά μονοπάτια της Wnt σηματοδότησης : Wnt/calcium και PCP οδοί.Η μη κανονική οδός Wnt/calcium οδηγεί μέσω αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε τροποποιήσεις σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση και ο ιστικός διαχωρισμός, ενώ δύναται να αναστείλει και τη σηματοδότηση μέσω β-κατενίνης (**αριστερά**). Η μη-κανονική οδός Wnt PCP (Planar-Cell Polarity) επάγει ενδοκυττάριες διεργασίες που οδηγούν σε τροποποίηση της ακτίνης, με άμεση επίδραση στον κυτταροσκελετό (**δεξιά**).*

3.7. Το Wnt στον πολλαπλασιασμό των MSCs

Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των MSCs. Τα MSCs εκφράζουν πλήθος Wnt προσδετών όπως τα Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt11, Wnt16, ποικίλους Wnt υποδοχείς όπως τους FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, καθώς και συν-υποδοχείς και Wnt αναστολείς (Ling et al., 2009).

Όταν οι Wnt πρωτεΐνες εκκρίνονται, προσδένονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στην εξωκυττάρια ουσία και λειτουργούν με έναν αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο (Ling et al., 2009). Μελέτες υποδεικνύουν πως το κανονικό Wnt ενισχύει την αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων, διατηρώντας τα σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Εξωγενής χορήγηση του Wnt3a σε κυτταροκαλλιέργειες προωθεί τον πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων MSCs, αυξάνει τον ρυθμό αυτοανανέωσής τους και μειώνει την απόπτωση (Boland et al., 2004). Πιθανά η επίδραση του Wnt3a στον πολλαπλασιασμό των MSCs ασκείται μέσω της ενεργοποίησης της κυκλίνης D1 (cyclin

D1) και του c-Myc, τα οποία επάγουν τον κυτταρικό κύκλο προς τον πολλαπλασιασμό (Ling et al., 2009). Η παραπάνω δράση οδηγεί σε συσσώρευση της β-κατενίνης με αποτέλεσμα την αναστολή δημιουργίας οστεοβλαστών και κατ' επέκταση της διαφοροποίησης προς την οστική σειρά (Boland et al., 2004).

Επιπλέον, υπερέκφραση του συνυποδοχέα του κανονικού μονοπατιού LRP5 φαίνεται να συμβάλει στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των MSCs. Αντιθέτως, ο προσδέτης Wnt5a του μη-κανονικού μονοπατιού καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των MSCs και αυξάνει την έκφραση των οστεοβλαστών (Baksh et al., 2007; Ling et al., 2009).

Ωστόσο δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο ποιο μονοπάτι (κανονικό ή μη) ευνοεί ή αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των MSCs. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί πως το κανονικό Wnt μονοπάτι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των MSCs με έναν αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο (Ling et al., 2009). Μάλιστα ο αναστολέας των LRPs, DKK1 είναι απαραίτητος για την παρεμπόδιση της εισόδου των MSCs στον κυτταρικό κύκλο και κατ' επέκταση στην φάση πολλαπλασιασμού, ανταγωνιζόμενος το Wnt μονοπάτι (Ling et al., 2009). Επιπλέον η ίδια μελέτη έδειξε πως το κανονικό Wnt μονοπάτι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των MSCs σε χαμηλές δόσεις ενώ τον αναστέλλει σε υψηλότερες (Ling et al., 2009). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως η ένταση της Wnt σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές ή/και σε αντίθετες βιολογικές λειτουργίες.

Τα αντικρουόμενα ευρήματα σχετικά με τον ρόλο του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού στην αυτοανανέωση των MSCs μπορεί να προκύπτουν και από τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και χειρισμού των κυττάρων. Απαιτείται λοιπόν να διευκρινιστεί ο πολύπλοκος μηχανισμός του Wnt κανονικού μονοπατιού και πως αυτό επιδρά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

3.8. Το Wnt στην οστεογενεση

Συνεχώς αυξανόμενα είναι τα δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρυθμιστικό ρόλο της Wnt σηματοδότησης στην ανάπτυξη και ομοιόσταση των οστών.

Αναφορικά με τα MSCs τα στοιχεία για την *in vitro* επίδραση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού είναι αντικρουόμενα καθώς φαίνεται να ασκεί τόσο ανασταλτικό όσο και επαγωγικό ρόλο στην διαφοροποίηση των MSCs προς οστεοκύτταρα (Liu et al., 2009). Κατά την οστεογένεση των MSCs τα Wnt11, FZD6, sFRP2, sFRP3 και Ror υπερεκφράζονται ενώ τα Wnt9a και FZD7 υποεκφράζονται (Boland et al., 2004; Ling et al., 2009).

Το κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να καταστέλλει τη διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα. Παρουσία του Wnt3a τα MSCs που διαφοροποιούνται προς

οστεοκύτταρα εμφανίζουν μειωμένη αλατοποίηση της εξωκυττάριας ουσίας (matrix mineralization) και μειωμένη ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης ενώ εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα δείκτες που σχετίζονται με την οστεογένεση (Boland et al., 2004).
Επιπλέον, αναστολή του GSK-3β, με εξωγενή χορήγηση Wnt3, ενεργοποιεί το κανονικό Wnt μονοπάτι καταστέλλοντας την εξαρτώμενη από δεξαμεθαζόνη οστεογένεση των ανθρώπινων MSCs (de Doer et al., 2004a). Ωστόσο η επίδραση Wnt-κανονικού μονοπατιού μπορεί να έχει ποικίλη επίδραση στην οστεογένεση των MSCs ανάλογα με το επίπεδο ενεργότητας τού.
Διαταραχή της Wnt σηματοδότησης με μια λειτουργική μετάλλαξη ή στοχευμένη «αναστολή/καταστροφή» του LRP5 επάγει την οστεοπόρωση στα ποντίκια (Visweswaran et al., 2015). Αντίθετα υψηλή δόση της εξωγενούς Wnt3a, ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού μέσω υπερέκφρασης του LPR5 ή μόνιμη παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής της β-catenin επάγουν την οστεογένεση των ανθρώπινων MSCs ή το σύνδρομο high bone mass στα ποντίκια (Qiu et al., 2007; Visweswaran et al., 2015). Έχει παρατηρηθεί πως η Wnt σηματοδότηση ευνοεί την οστεογένεση εις βάρος της λιπογένεσης (Kang et al., 2007, Cawthorn et al.,2012).
Στα ποντίκια το Wnt-κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι επάγει την οστεογένεση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων, αναστέλλοντας την έκφραση των PPAR-γ και CEBP-α και επάγοντας την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της οστεογένεσης RUNX2, DLX5 ή osterix (Visweswaran et al., 2015) Ωστόσο η δράση της Wnt σηματοδότησης στην οστεογένεση εξαρτάται επίσης και από το στάδιο των κυττάρων στόχων. Πιο συγκεκριμένα όταν τα MSCs έχουν μπει στην οστεογενετική σειρά η Wnt σηματοδοτηση διεγείρει τη διαφοροποίηση τούς, ενώ την ίδια στιγμή αναστέλλει την τελική διαφοροποίηση των ώριμων οστεοβάστών (Kahler & Westendorf 2003, Kahler 2008). Αναφορικά με την αναβολική δράση του Wnt στην οστεογένεση, η υπερέκφραση του ανταγωνιστή του Wnt sFRP4, στους οστεοβλάστες, εμποδίζει την οστεογένεση των MSCs και οδηγεί σε απώλεια της οστικής μάζας (Visweswaran et al., 2015).
Αντιθέτως έλλειψη του SFRP1 μειώνει την απόπτωση και επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων οστεοβλαστών και MSCs, ενώ συγχρόνως επάγει το σχηματισμό οστικών δοκίδων (trabecular bone formation) και βελτιώνει την επούλωση καταγμάτων (Visweswaran et al., 2015) υποδεικνύοντας την-ανασταλτική δράση των Wnt ανταγωνιστών στην οστεογένεση.

Αρκετά είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι σηματοδότησης Hippo, που αλληλεπιδρούν με το Wnt μονοπάτι. Η Hippo σηματοδότηση περιλαμβάνει την Yes-associated protein 1 (YAP1), η οποία ρυθμίζει θετικά το Dkk1, οπότε με τη σειρά

της παρεμποδίζει την ανασταλτική δράση του Wnt ως προς την οστεογενεση των MSCs (Seo et al., 2013). Η θετική αυτή επίδραση του Wnt στην οστεογένεση έχει παρατηρηθεί τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ποντικίσια MSCs (Gregory et al., 2005). Συνοψίζοντας, οι μέχρι στιγμής μελέτες υποδεικνύουν πως το κανονικό Wnt μονοπάτι επάγει την οστεογένεση, ενώ οι ανταγωνιστές τού παρεμποδίζουν την οστεογένεση των MSCs.

Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν πως το Wnt κανονικό μονοπάτι μπορεί και να αναστείλει την οστεογένεση των ανθρώπινων μυελικών MSCs (Baksh et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα ο παράγοντας sFRP3 φαίνεται να ανταγωνίζεται το μη-κανονικό Wnt μονοπάτι προσδένοντας το Wnt5a, το οποίο με τη σειρά του παρεμποδίζει/αναστέλλει την ανασταλτική δράση του κανονικού Wnt μονοπατιού, επάγοντας έτσι την οστεογένεση (Yamada et al., 2013).

Όλα τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν την εκτεταμένη συμμετοχή της Wnt σηματοδότησης στο μοριακό δίκτυο που ρυθμίζει την διαφοροποίηση προς την οστεογενετική σειρά, και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όταν προσδιορίζονται νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση νοσημάτων των οστών.

3.9. Το Wnt στη λιπογένεση

Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται τόσο στην αναστολή της διαφοροποίησης των MSCs προς οστεοκύτταρα όσο και ως προς λιποκύτταρα. Δεδομένα από την τελευταία δεκαετία υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της Wnt σηματοδότησης στη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων προς λιποκύτταρα (Christodoulides et al., 2009). Κατά τη λιπογένεση τα πολυδύναμα MSCs ‘’δεσμεύονται’’ στην λιπογενετική σειρά, οδηγώντας στο σχηματισμό των προ-λιποκυττάρων (preodicosytes). Απαντώντας στα απαραίτητα «σήματα» αναστέλλεται η ανάπτυξη των προ-λιποκυττάρων και ωθούνται προς την τελική διαφοροποίηση, δηλαδή σε ώριμα λιποκύτταρα. Έχει βρεθεί πως όταν το Wnt-κανονικό μονοπάτι ενεργοποιείται από το Wnt3a, μειώνεται η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της λιπογένεσης, PPAR-γ και adipocyte-fatty acid-binding protein (FAB) στα MSCs.

Τα μόρια Wnt1 και Wnt10b του κανονικού μονοπατιού ή η μόνιμα μεταλλαγμένη και ενεργοποιημένη μορφή της β-κατενίνης εμποδίζουν την προ-λιπογενετική διαφοροποίηση, μειώνοντας την έκφραση των λιπογενετικών μεταγραφικών παραγόντων CEBP-α και PPAR-γ. Πιθανώς το Wnt10b να προσδένει στους υποδοχείς FZD1,2 και 5 ενεργοποιώντας την σηματοδότηση μέσω της β-κατενίνης (Bennett et al., 2002). Δυο προσδέτες του μη-κανονικού μονοπατιού, Wnt4 και Wnt5α, φαίνεται να

ασκούν επαγωγική δράση στα 3T3 κύτταρα προς προ-λιποκύτταρα μέσω του PKC-CamkII μονοπατιού. Επιπλέον, φαίνεται το Wnt5a να ανταγωνίζεται το Wnt – κανονικό μονοπάτι. Στα MSCs το Wnt μονοπάτι ενεργοποιείται αναστέλλοντας τη λιπογένεση με χρήση του 6-bromo-indirubin-3'-oxime (BIO), ενός αναστολέα του GSK-3β (Visweswaran et al., 2015).

Στα MSCs του λιπώδους ιστού, ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού, μέσω «σίγασης» των μορίων sFRP4 και DKK1, δύο ανταγωνιστών του Wnt, οδηγεί σε μειωμένη λιπογενετική δραστηριότητα, με αντίκτυπο τόσο στη συσσώρευση των λιπιδικών κυστιδίων όσο και στη μείωση των δεικτών της λιπογένεσης.

Αντιθέτως εξωγενής χορήγηση των ανθρώπινων MSCs με sFRP1 και sFRP4 οδηγεί σε αυξημένη έκκριση αδιπονεκτίνης (adiponectin).

Μάλιστα κατά τη διαφοροποίηση των MSCs προς λιποκύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης των sFRP4 και DKK1 αυξάνονται συγκριτικά με την προγενέστερη αδιαφοροποίητη κατάστασή τους. Επιπλέον, εξωγενής χορήγηση του sFRP4 επάγει τη λιπογένεση των MSCs (Visweswaran et al., 2015).

Καταλήγοντας, η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση των MSCs προς λιποκύτταρα, ενώ η παρουσία των Wnt ανταγωνιστών οδηγεί στο αντίθετο αποτέλεσμα. Τα παραπάνω θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όταν αναπτύσσονται θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση νόσων όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης (Hoffmann et al., 2014; Visweswaran et al., 2015).

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η σύγκριση των επί μέρους ιδιοτήτων των WJ-MSCs και BM-MSCs ως προς τις παρακάτω παραμέτρους:

1. Τα ex vivo αναπτυξιακά χαρακτηριστικά και την ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs.

2. Την κυτταρική γήρανση στα ex vivo αναπτυσσόμενα WJ-MSCs.

3. Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των μορίων της οικογένειας Wnt που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs αλλά και στην ομοιόσταση της αιμοποιητικής φωλιάς.

4. Την ικανότητα των WJ-MSCs να στηρίζουν ex vivo την ανάπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών (CD34+) κυττάρων.

5. Την παραγωγή επαγωγέων και αναστολέων της αιμοποίησης σε υπερκείμενα WJ-MSCs και BM-MSCs καλλιεργειών.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ομάδα μελέτης

Μελετήσαμε WJ-MSCs και BM-MSCs που ελήφθησαν από 18 τελειόμηνα νεογνά (38 ως 39 εβδομάδων) από φυσιολογικό τοκετό και από 18 υγιείς μάρτυρες, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ορθοπεδική επέμβαση για αρθροπλαστική ισχίου (9 άρρενες και 9 θήλεις, διάμεσης ηλικίας: 50 έτη), αντιστοίχως. Η μελέτη είχε λάβει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, και ελήφθη γραπτή συγκατάθεση από τις μητέρες-δοτριες του ομφάλιου λώρου και από τους υγιείς μάρτυρες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ελσίνκι.

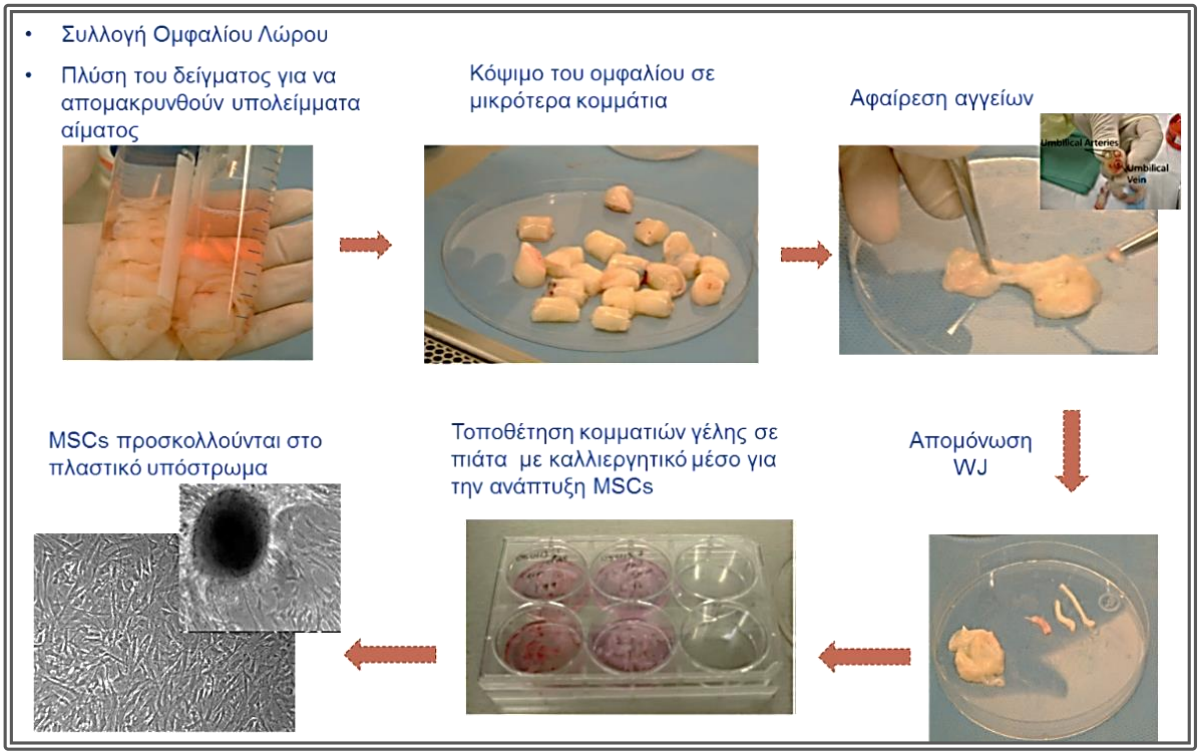
Απομόνωση WJ-MSCs από τον ομφάλιου λώρο

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 Hank's ισότονο διάλυμα άλατος. 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 τοποθετούνταν σε καλλιεργητική επιφάνεια πολυστυρενίου, χωρίς περαιτέρω ενζυμική επεξεργασία.

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 ατμόσφαιρα πλήρους υγρασίας και σε συνθήκες 37ºC και 5% CO_2. 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 δέκα ανακαλλιέργειες (Passages - P) ***[Εικόνα 4]***.



Εικόνα 4. *Διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας του ομφαλίου λώρου για απομόνωση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) από τη γέλη* του Wharton (WJ).

Απομόνωση μυελικών λεμφομονοπύρηνων κυττάρων (BMMCs – Bone Marrow Mononuclear Cells)

Δείγματα μυελού των υγιών μαρτύρων λαμβάνονταν με αναρρόφηση από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία. Τα δείγματα λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια χειρουργείου αρθροπλαστικής ισχύου. Ο μυελικός πολφός αραιωνόταν σε αναλογία 1:1 σε καλλιεργητικό υλικό Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10IU/mL ηπαρίνης (heparin; Sigma, St.Louis MO, USA) 100IU/mL πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) και 10% ορό FBS.

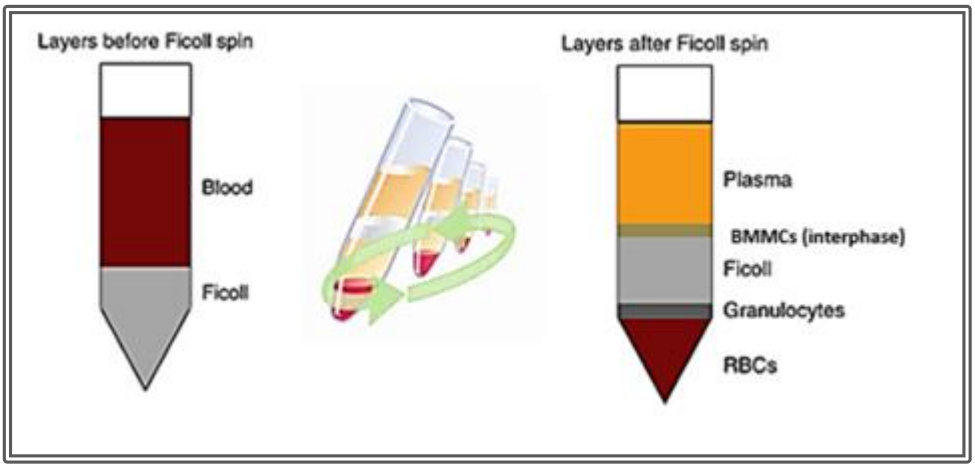
Όλα τα υλικά προέρχονταν από την εταιρεία Gibco Invitrogen, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά.

Στη συνέχεια, το αραιωμένο δείγμα μυελού επιστιβάζονταν σε Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich,1.077gr/cm^3) σε αναλογία 2:1 (ενειώρημα μυελού : Histopaque-1077), και σχηματίζονταν δύο στιβάδες με το Histopaque-1077 στην κάτω στιβάδα και το

μυελό στην επάνω. Κατόπιν, ακολουθούσε φυγοκέντρηση χωρίς φρένο στα 1600rpm για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Το Histopaque-1077 έχει πυκνότητα μεγαλύτερη από εκείνη των BMMCs αλλά μικρότερη από εκείνη των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται μια διαβάθμιση πυκνότητας που επιτρέπει την καθίζηση των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων στον πυθμένα του σωληναρίου διαμέσου του Histopaque-1077, ενώ τα λεμφομονοπύρηνα BMMCs ανευρίσκονται μεταξύ Histopaque-1077 και πλάσματος [***Εικόνα 5***].

Η στοιβάδα των BMMCs συλλέγονταν με γυάλινη πιπέτα Pasteur και ακολουθούσε πλύση με θρεπτικό υλικό και φυγοκέντρηση (1600rpm για 5min, με φρένο).



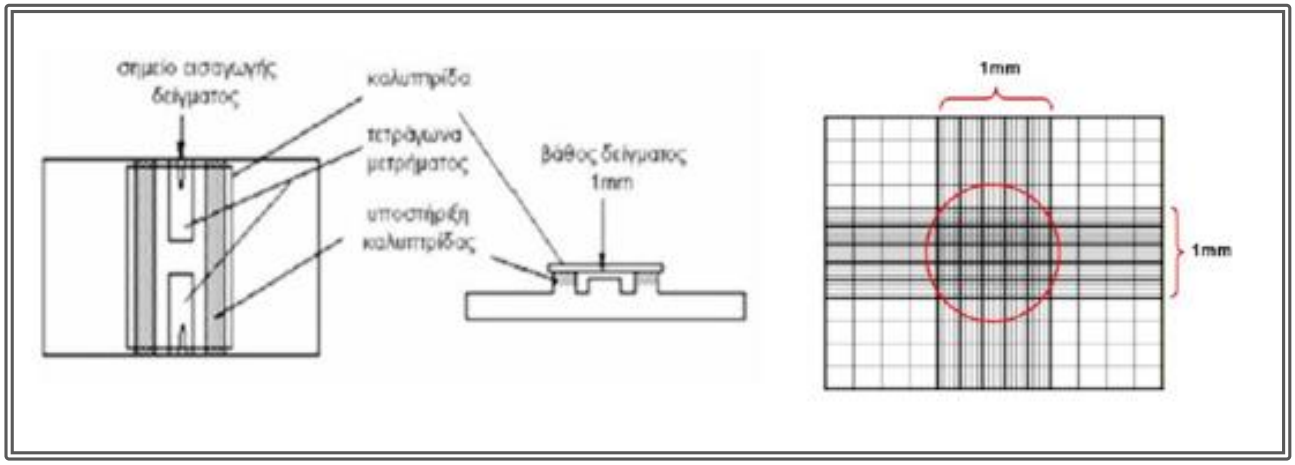
Εικόνα 5*. Διαδικασία επεξεργασίας του μυελού για απομόνωση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων που περιέχονται στο κλάσμα των μυελικών λεμφομονοπύρηνων (BMMCs), με επιστοίβαση σε Histopaque-1077, ένα στείρο διάλυμα πολυσακχαρόζης και διατριζοϊκού νατρίου, ρυθμισμένο σε πυκνότητα 1.077g / mL.*

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 BMMCs 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 [***Εικόνα 6***]. 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.



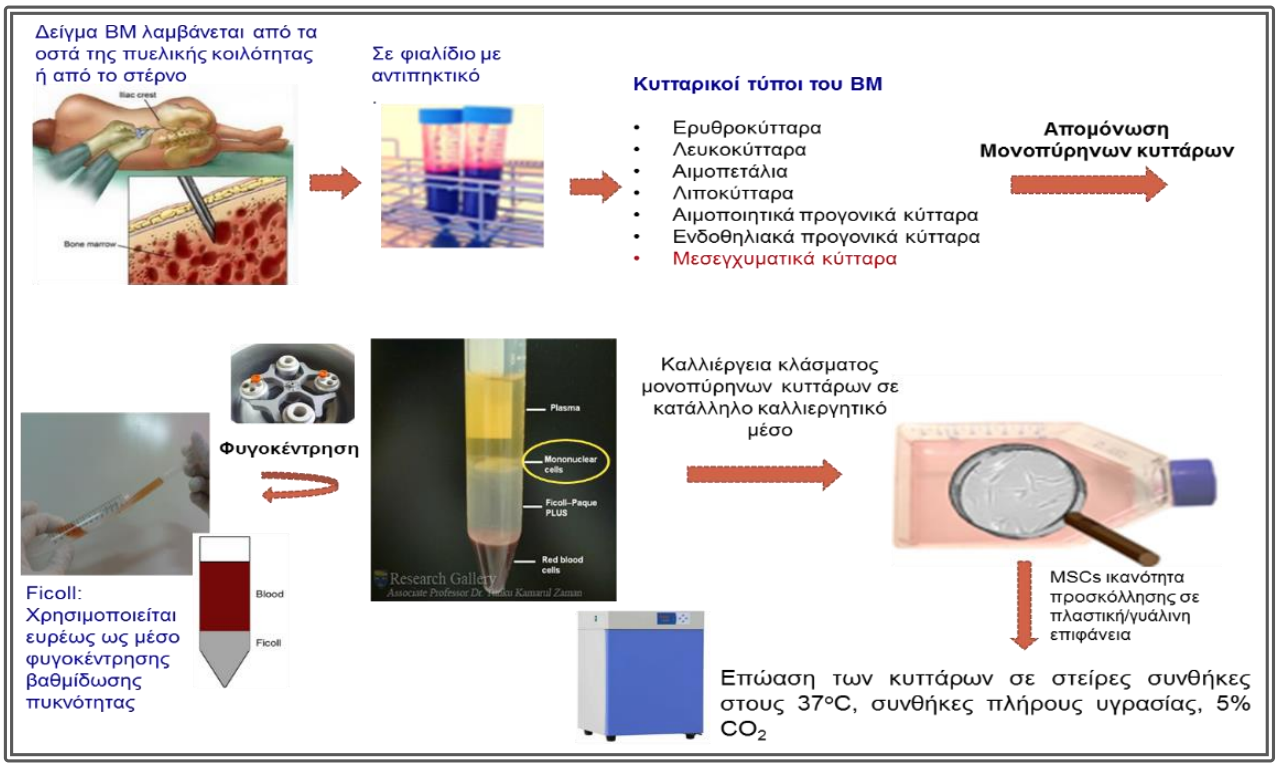
Εικόνα 6*. Η πλάκα μέτρησης Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο χρησιμοποιείται για την μέτρηση κυττάρων.*

Καλλιέργεια και ανάπτυξη BM-MSCs

Τα BMMCs που απομονώνονταν τοποθετούνταν σε $25cm^2$ φλάσκες ($25*10^6$ BMMCs / flask) [***Εικόνα 7***] και καλλιεργούνταν στο MSC-medium όπως αναφέρεται παραπάνω, σε θερμοκρασία 37°C, με 5% CO_2 και σε ατμόσφαιρα πλήρους υγρασίας [***Εικόνα 8***].

Εικόνα 7. *Καλλιεργητικές επιφάνειες πολυστυρενίου – φλάσκες, 25cm² και 75cm²*

Στις πρώτες 24-48 ώρες γινόταν αφαίρεση των μη-προσκολλώμενων αιμοποιητικών κυττάρων, ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων με PBS (Phosphate Buffered Saline solution, Gibco Invitrogen) και προσθήκη φρέσκου MSC-medium. Έκτοτε το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν δις εβδομαδιαίως και απομακρύνονταν τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί. Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα κάλυπταν το 80-90% της καλλιεργητικής επιφάνειας, αποκολλούντο με τη χρήση 0.25% trypsin - 1mM EDTA (Gibco Invitrogen) ύστερα από επώαση 5 λεπτών στους 37°C. Η δράση της θρυψίνης απενεργοποιούνταν με τουλάχιστον διπλάσιο όγκο MSC-medium. Ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων με PBS και επαναιώρηση σε κατάλληλο όγκο MSC-medium, καθώς και μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Τα κύτταρα επανακαλλιεργούντο, σε συγκέντρωση 2000 κύτταρα/cm² σε 75cm²-φλάσκες, για 10 συνολικά ανακαλλιέργειες (passages – P).



Εικόνα 8. *Σύνοψη της διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας μυελού για απομόνωση και καλλιέργεια των μυελικών μεσεγχυματικών κυττάρων (BM-MSCs).*

Τα BM-MSCs από την ανακαλλιέργεια P2, χρησιμοποιούνταν για διαφοροποίηση προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα με τα ανάλογα θρεπτικά υλικά διαφοροποίησης (Kastrinaki et al., 2008).

Δείγματα από τα υπερκείμενα των P2, P6, P10 κυτταροκαλλιεργειών φυλάσσονταν (-80^{o}C) για μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών: Fms-related Tyrosine Kinase 3 ligand (Flt3-l; Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (High Sensitivity human G-CSF; Quantikine; R&D Systems), Stromal Cell-Derived Factor 1 (human CXCL12/SDF-1a; Quantikine; R&D Systems) και Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (human GM-CSF; bms283/bms283ten Affymetrix; eBioscience) με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο (ELx800,Universal Microplate Reader).

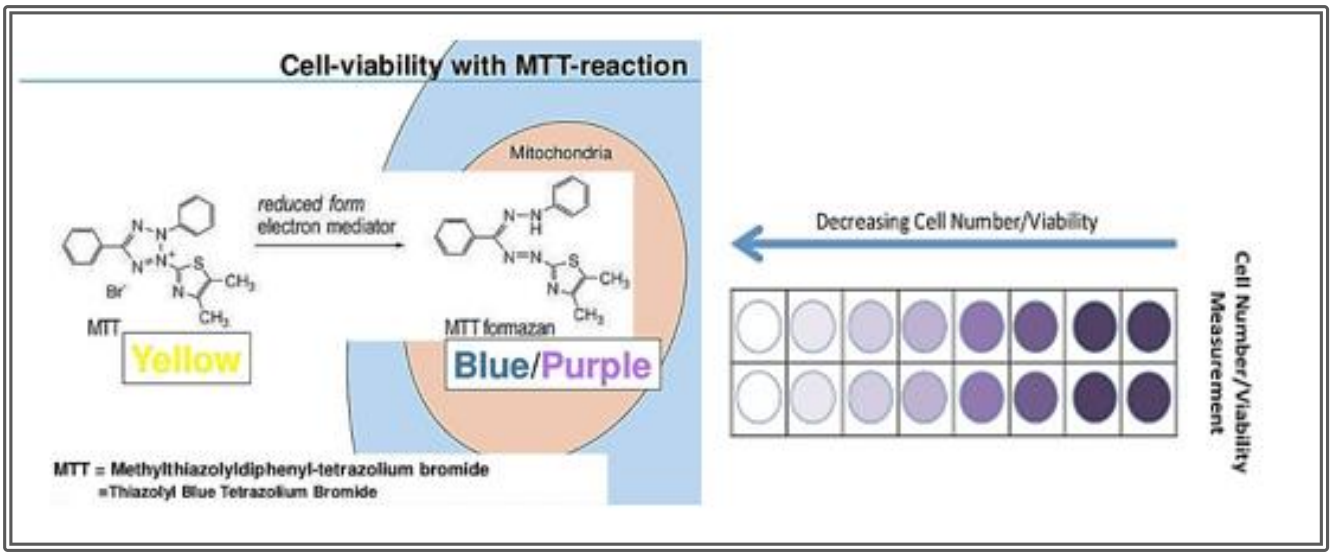
Εκτίμηση της βιωσιμότητας και πολλαπλασιαστικής ικανότητας των MSCs

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) στις ανακαλλιέργειες P2, P6, P10.

Η δοκιμασία MTT βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών (μεταβολικά ενεργών) κυττάρων να ανάγουν ένα άλας του τετραζολίου, το (3{4,5-διμέθυλθειαζολ-2-yl}-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου), με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (succinic dehydrogenase), με αποτέλεσμα την παραγωγή ιωδών κρυστάλλων [***Εικόνα 9***]. 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 (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Η δοκιμή του MTT χρησιμοποιείται περισσότερο λόγω του χαμηλού κόστους, ακρίβειας, ταχύτητας και μη-χρήσης ραδιοϊσοτόπων. Επίσης η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει βελτιστοποιηθεί για διάφορα είδη κυττάρων.

- Πιο αναλυτικά για τη μελέτη της βιωσιμότητας των MSCs μέσω της μεθόδου MTT χρησιμοποιήθηκαν πλάκες των 48-βοθρίων, και κάθε δείγμα επιστρώνονταν 24 βοθρία με 2500 MSCs στο καθένα. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν δις εβδομαδιαίως και η χρωμομετρική δοκιμή MTT πραγματοποιούνταν τις μέρες 3, 6, 9, 12, 15,18 και 21 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 πηγάδι. Ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες στους 37ºC / 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 (OD_{630}) (EL_x800,Universal Microplate Reader).



Εικόνα 9*. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων, και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. 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.*

- Επιπλέον, η πολλαπλασιαστική ικανότητα των καλλιεργούμενων MSCs εκτιμήθηκε με προσδιορισμό του χρόνου του κυτταρικού διπλασιασμού (Population Doublings, PD) σε όλη τη διάρκεια της ex vivo καλλιέργειας, P2-

P10. 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 (Kastrinaki et al., 2008, Pavlaki et al., 2014). 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). Τα συγκεντρωτικά PDs υπολογίζονται με βάση το λόγο Nx/N0.

Μελέτη των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών MSCs

Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των MSCs που απομονώνονταν από τα P1-P10, 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 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).

Μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων με χρώση 7-actinoaminomycin-D (7-AAD)

Η απόπτωση των κυττάρων μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας τη χρώση με 7-actinoaminomycin-D (7-AAD; Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) σε P2 και P6 κύτταρα (όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Philpott et al., 1996).

Η 7-AAD είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία προσδένεται στο γενωμικό υλικό παρεμβαίνοντας μεταξύ των βάσεων κυτοσίνης και γουανίνης. Η πρόσδεση της εξαρτάται από το βαθμό ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι τα ζώντα κύτταρα, των οποίων η κυτταρική μεμβράνη είναι ακέραια δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής, σε αντίθεση με τα αποπτωτικά και τα νεκρά κύτταρα τα οποία σημαίνονται μέτρια και εντονότερα, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό διακρίνονται τρεις κυτταρικοί πληθυσμοί βάση των οποίων εκφράζονται και τα αποτελέσματα δηλαδή, 7-AAD^{neg} (ζωντανά κύτταρα), 7-AAD^{dim} (πρώιμα αποπτωτικά) και 7-AAD^{brigh} (όψιμα αποπτωτικά/νεκρά κύτταρα).

- Αναλυτικά, μετά την επώαση με το αντίσωμα αντι-CD29 που αποτελεί δείκτη επιφανείας των MSCs, ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων και επώαση με διάλυμα 20μg/ml 7-AAD για 15λεπτά και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 300μl διαλύματος 2% PFA. Τα πειράματα και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιούνταν άμεσα, εντός 30 min, στον κυτταρομετρητή ροής Beckman Coulter Cytomics FC500.

Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Προκειμένου να μελετηθεί ο κυτταρικός κύκλος, MSCs στο P2 επωάζονταν με RNase A (PureLink RNase A; Invitrogen) και χρωματίζονταν με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI, Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η μέτρηση του ολικού DNA και ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου, βασίζεται στην ικανότητα του ιωδιούχου προπιδίου να δεσμεύεται στοιχειομετρικά στη διπλή έλικα του DNA (αλλά και μεταξύ των βάσεων του RNA) έτσι ώστε το DNA που έχει συνδέσει το φθοριόχρωμα και φθορίζει να αντικατοπτρίζει την

περιεκτικότητα του DNA στον ζητούμενο πληθυσμό. Το ένζυμο RNAse A χρησιμοποιούταν για να απομακρύνει το RNA από τα δείγματά.

- Πιο συγκεκριμένα, MSCs που συλλέγονταν με τη χρήση θρυψίνης (0.25% trypsin-EDTA), πλένονταν με PBS (φυγοκέντρηση 1500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου), μονιμοποιούνταν με 70% παγωμένη (4°C) αιθανόλη και φυλάσσονταν για τουλάχιστον 16ώρες στους -20°C.

Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, πραγματοποιούντο 2 πλύσεις με 1X PBS, προσθήκη 50μg/mL ιωδιούχου προπιδίου (PI, Invitrogen) και 0.5mg/mL RNase A (PureLink RNase A; Invitrogen). Ύστερα από επώαση 30 λεπτών στους 37°C, στο σκοτάδι, ακολουθούσε προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής.Τουλάχιστον 100.000 κύτταρα απαιτούνταν ανά δείγμα.

Τα πειράματα και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιούνταν άμεσα σε κυτταρομετρητή ροής της Beckman Coulter Cytomics FC500.

Κυτταρογενετική ανάλυση των MSCs

Τα MSCs ελέγχθηκαν κυτταρογενετικά στα κυτταρικά περάσματα P2,P6 και P10. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα στο κατάλληλο κυτταρικό πέρασμα καλλιεργούνταν σε 4 φλάσκες των 25cm^2 με 100.000 κύτταρα ανά φλάσκα.

Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα κάλυπταν το 80-90% της καλλιεργητικής επιφάνειας το θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας αφαιρούνταν και μετά από μια πλύση με PBS αντικαθίστατο με διάλυμα RPMI-1640, εμπλουτισμένο με 5%FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 IU/ml πενικιλλίνη-στρεπτομυκίνη και 200μl κολχικίνης/ανά φλάσκα, σε ατμόσφαιρα πλήρους υγρασίας και σε συνθήκες 37^oC και 5% CO_2. Ύστερα από επώαση 48 ωρών, ακολουθούσε η διαδικασία θρυψινοποίησης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά από μια πλύση με PBS απομακρύνονταν το υπερκείμενο και η πελέττα των κυττάρων μεταφέρονταν σε σωληνάρια των 15ml και επαναδιαλύοταν με 10ml υπότονου διαλύματος KCl (2.8gr KCl / 500ml distilled water), ώστε να χαλαρώσει η δομή της χρωματίνης. Ακολουθούσε επώαση για 40-45 λεπτά στους 37^oC, στο τέλος της επώασης προστίθεντο 4-5 σταγόνες φρέσκου παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1100rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μονιμοποιητικό αποτελούνταν από μεθανόλη (Scharlau) και οξικό οξύ (Fisher Scientific) σε αναλογία 3 μέρη αιθανόλης:1 μέρος οξικού οξέος. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αφαιρούνταν, ακολουθούσε η μονιμοποίηση των κυττάρων κατά την οποία προστίθεντο 5-6 σταγόνες μονιμοποιητικού διαλύματος

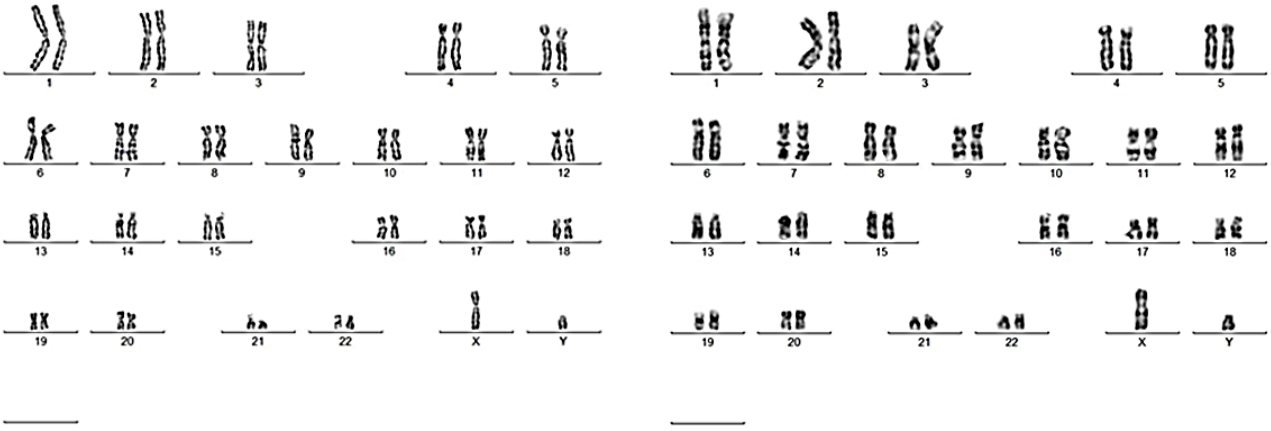
με ταυτόχρονη ανακίνηση του σωληνάριου μέχρι τον τελικό όγκο των 5ml, και η επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες και επαναλαμβάνονταν η διαδικασία για μια φορά ακόμα. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 5ml μονιμοποιητικού διαλύματος. Τα μονιμοποιημένα πλέον κύτταρα φυλάσσονταν στους -20^{o}C για τουλάχιστον 24 ώρες πριν το στρώσιμο τούς σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Στρώσιμο των μονιμοποιημένων MSCs και χρωμοσωμική ανάλυση

Την ημέρα της επίστρωσης των μονιμοποιημένων κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες , προηγούνταν μια φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1100rpm και στη συνέχεια η πελέττα των κυττάρων επαναδιαλύοταν σε 5ml φρέσκου μονιμοποιητικού διαλύματος. Συνολικά επιστρώνονταν 3-4 αντικειμενοφόρες πλάκες ανά δείγμα με 3-4 σταγόνες από το εκάστοτε δείγμα σε καθένα πλακάκι. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες φυλάσσονταν για τουλάχιστον 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν βαφτούν με τη χρώση Giemsa (Scharlau). Την ημέρα της χρώσης οι αντικειμενοφόρες πλάκες επωάζονταν στους 60^{o}C για μια ώρα. Αρχικά εμβαπτίζονταν για 5 δευτερόλεπτα σε 0,25% θρυψίνη (0,25% Trypsin-EDTA, 1X), στη συνέχεια δυο φορές σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) για την αδρανοποίηση της θρυψίνης, και τελικά σε διάλυμα χρώσης 15% Giemsa (η χρωστική αραιώνονταν με απιονισμένο νερό) για ένα λεπτό (GTG-ζώνωση). Έπειτα ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και αφήνονταν να στεγνώσουν στον αέρα πριν αναλυθούν σε οπτικό μικροσκόπιο (Axioskope2plus,Zeiss, Germany).

Όπου ήταν δυνατό, αναλύονταν 15 με 20 μεταφάσεις (εύρος 0-25). Για την απεικόνιση των μεταφάσεων χρησιμοποιούνταν το φωτογραφικό σύστημα Ikaros Karyotyping System (Metasystems) και τα δεδομένα αξιολογούνταν σύμφωνα με το ISCN 2005 (International System of Human Cytogenetic Nomenclature: eds Shaffer LG & Tommerup N, S. KArger, Basel, Switzerland) [***Εικόνα 10***].

Μια χρωμοσωμική ανωμαλία χαρακτηρίζονταν ως κλωνική, όταν τουλάχιστον 2 μεταφάσεις είχαν την ίδια δομική αναδιάταξη (translocation) ή χρωμοσωμική προσθήκη (insertion), ενώ για μια χρωμοσωμική έλλειψη (deletion) έπρεπε να ταυτοποιηθούν τουλάχιστον 3 ίδιες μεταφάσεις.



Εικόνα 10. *Παραδείγματα φυσιολογικών καρυοτύπωνι από καλλιεργούμενα BM-MSCs (αριστερά) και WJ-MSCs (δεξιά) από το κυτταρικό πέρασμα P2. Τα δύο δείγματα προέρχονται από άρρενες δότες [46,XY].*

Φθορίζων in situ υβριδισμός (Fluorescence in situ hybridization – FISH)

Όπου κρίνονταν αναγκαίο, τα δείγματα μελετιούνταν με μοριακή κυτταρογενετική τεχνική (FISH). Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, όπου ειδικά σημασμένοι ανιχνευτές για μια αλληλουχία / στόχο τοποθετούνται πάνω στις αντικειμενοφορες πλάκες με τα μονιμοποιημένα κύτταρα. Μετά την αποδιάταξη του DNA των κυττάρων και του ανιχνευτή, ακολουθεί η υβριδοποίηση του σημασμένου ανιχνευτή στη συμπληρωματική του αλληλουχία. Στη μελέτη χρησιμοποιούνταν εμπορικά διαθέσιμοι ανιχνευτές για συγκεκριμένο γενετικό τόπο (locus specific probes) για τα χρωμοσώματα 5 [LSI EGR1(5q31)/D5S23,D5S721 (Abbott Laboratoires, Illinois, USA), EGR1(5q31)/RPS14(5q33) (Metasystems, Germany) και 7 [LSI D7S486(7q31)/CEP7 (Abbott Laboratories, Illinois, USA)], χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των κατασκευαστών.

Τα σήματα από τουλάχιστον 100 μεσοφασικούς πυρήνες παρατηρούνταν, μετρούνταν και καταγράφονταν κάθε φορά χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss, Jena, Germany) με φίλτρο για DAPI (μπλε), FITC (SpectrumGreen), και TexasRed (SpectrumOrange).

Εκτίμηση της διαφοροποιητικής ικανότητας των MSCs

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

- Για την επαγωγή της διαφοροποίησης προς **λιποκύτταρα** 80000 MSCs/cm^2 απλώνονταν σε 60 mm τρυβλία Petri και αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG; Gibco, Invitrogen) εμπλουτισμένου 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 37^{o}C / 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 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 από διηθητικό χαρτί και, πέντε λεπτά πριν τη χρήση, φιλτράρισμα από 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** 40000 MSCs/cm^2 απλώνονταν σε 60 mm τρυβλία Petri και αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από α-MEM εμπλουτισμένου με 2% FBS, 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη, 0.1 μM δεξαμεθαζόνη, 25 mg/lt φωσφορικό άλας του ασκορβικού (ascorbate-2-phosphate), και 3 mM δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) (καλλιεργητικό μέσο οστογένεσης). Η καλλιέργεια διαρκούσε 14 ημέρες σε συνθήκες 37^{o}C / 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% φορμαλδεϋδης (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 2-5 λεπτά. Την αφαίρεση της χρωστικής ακολουθούσε πλύση των κυττάρων δυο φορές με WFI και μορφολογική αξιολόγηση 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 Aqueous Silver Nitrate Solution) 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.

- Για την επαγωγή της **χονδρογένεσης** $0.5x10^6$ MSCs κατακρημνίζονταν σε σωληνάρια των 15ml και εν συνεχεία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM-HG; Gibco) εμπλουτισμένου με 6.25 μg/mL ινσουλίνη, 6.25 μg/mL τρανσφερίνη, 1.33 μg/mL λινολεϊκό οξύ, 1.25 mg/mL αλβουμίνη βόειου ορού, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο, 0.17 mM φωσφορικό άλας του ασκορβικού, 0.1 μM δεξαμεθαζόνη, 0.35 mM L-προλίνη, 6.25 ng/mL σεληνιώδες οξύ, 0.01 μg/mL και αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμόυ β3 (transforming growth factor β3, TGF-β3) (καλλιεργητικό μέσο χονδρογένεσης). Τα κύτταρα καλλιεργούνταν με το χονδρογενετικό μέσο διαφοροποίησης για 21 μέρες σε συνθήκες 37^{o}C / 5% CO_2 και πλήρους υγρασίας, με πλήρη ανανέωση θρεπτικού δις εβδομαδιαίως.Η εκτίμηση της χονδρογένεσης γινόταν με χρώση Alcian blue. Η χρώση **Alcian Blue** παρασκευάζονταν με ανάμιξη 1:1 v/v υδατικού διαλύματος 3% w/v Alcian Blue και διαλύματος 3% w/v CH3COOH. Οι σωροί των κυττάρων που προέκυπταν από την καλλιέργεια, αφού τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε φούρνο 56^{o}C για 50 λεπτά, εμβαπτίζονταν δυο φορές σε ξυλόλη (xylol) για 5 λεπτά, δυο φορές σε 96% αιθανόλη (ethanol) για 3 λεπτά, δυο φορές σε 80% αιθανόλη για 1 λεπτό και δυο φορές σε 70% αιθανόλη για 1 λεπτό. Κατόπιν ξεπλένονταν με νερό της βρύσης και με dH_2O (distilled water). Στη συνέχεια εμβαπτίζονταν σε Haematoxylin Harris για 20

λεπτά, ξεπλένονταν με νερό βρύσης και βάφονταν για 10 λεπτά με 1.5% Alcian blue, 1.5% v/v acetic acid σε dH_2O. Ξεπλένονταν και πάλι με νερό βρύσης και τοποθετούνταν δύο φορές σε 96% αιθανόλη, δυο φορές σε 100% αιθανόλη και δυο φορές σε xylol. Στη συνέχεια, τα χονδροκύτταρα αναγνωρίζονταν μορφολογικά σε οπτικό μικροσκόπιο.

Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση και λιπογένεση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οστεογένεση και τη λιπογένεση εκτιμήθηκε σε P2 MSC από καλλιέργειες ομφαλικών και μυελικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων οστεογένεσης: **ALP** (alkaline phosphate), **OSC** (osteocalcin), **DLX5** (distal less homeobox protein 5), **RUNX2** (runt-related transcription factor 2) και των γονιδίων λιπογένεσης: **CEBPA** (CCAAT/enhancer-binding protein alpha), **PPARG** (peroxisome proliferator activated receptor gamma).
Ολικό RNA απομονώνονταν από P2 MSC καθώς και από διαφοροποιημένα κύτταρα. Το ολικό RNA απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας με το σύστημα RNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Σε όλες τις κατεργασίες δειγμάτων συμπεριλαμβάνονταν το στάδιο επώασης των νουκλεϊκών οξέων με DNAse, ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις γενωμικού DNA στα τελικά δείγματα.
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^{o}C και 30 δευτερόλεπτα στους 60^{o}C). Για την επαλήθευση της ειδικότητας των αντιδράσεων, στο τέλος κάθε PCR δημιουργούνταν μια καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) (62^{o}C-95^{o}C).
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 $\Delta Ct = Ct_{\text{γονιδίου ενδιαφέροντος}} - Ct_{\text{GAPDH}}$.

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'
DLX5	5'-GCC ACC AAC CAG CCA GAG AA-3'	5'-GCG AGG TAC TGA GTC TTC TGA AAC C-3'
RUNX2	5'-GGC CCA CAA ATC TCA GAT CGT T-3'	5'-CAC TGG CGC TGC AAC AAG AC-3'
CEBPA	5'-AAG AAG TCG GTG 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'
GAPDH	5'-CATGTTCCAATATGATTCCACC-3	5'-GATGGGATTTCCATTGATGAC-3'

Εκτίμηση της γήρανσης των καλλιεγούμενων MSCs

- Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση

Η εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την γήρανση των MSCs έγινε μέσω qRT-PCR .

Ολικό RNA απομονωνόταν από P2, P6 και P10 ανακαλλιέργειες των MSC με τη χρήση του RNeasy Mini Kit. Από κάθε δείγμα, σε 1μg RNA γινόταν αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA με SuperScript II First-Strand cDNA synthesis kit. 100ng cDNA πολλαπλασιάζονταν με qRT-PCR, με αντίδραση των 20μL με KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix και 10μM κάθε ειδικού εκκινητή για **CDKN1A** (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A /P21) , **CDKN2B** (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B (P15, Inhibits CDK4), **CDKN2A** (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (Melanoma, P16, Inhibits CDK4), **RB1**, **TP53** και **PARG1**. Οι αντιδράσεις έγιναν σε Rotor Gene 6000 με πρόγραμμα συνολικά 45 κύκλων δυο σταδίων στους 95^{o}C για 15 δευτερόλεπτα και στους 60^{o}C για 30 δευτερόλεπτα. Στο τέλος κάθε κύκλου για την επιβεβαίωση της ειδικότητας κάθε αντίδρασης δημιουργούνταν μια καμπύλη αποδιάταξης (62-95^{o}C).
Σαν γονίδιο κανονικοποίησης των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH. Οι τιμές της έκφρασης των γονιδίων υπολογίζονταν ως $2^{-\Delta Ct}$, όπου $\Delta Ct = Ct_{\text{γονιδίου ενδιαφέροντος}} - Ct_{\text{GAPDH}}$.
Παρακάτω αναγράφονται οι αλληλουχίες των ζευγών εκκινητών (forward και reverse) που χρησιμοποιήθηκαν:

PARG1	5’-CAATGATCATGCCCAGTGCA-3’	5’-GATCGTGATCTGTGCCAGGA-3’
CDKN2B	5’-CCCAACTCCACCAGATAGCA-3’	5’-GGGATTTCCGCATCCTAGCA-3’
CDKN2A	5’-CCCAACGCACGAATAGTTAC-3’	5’-CACGGGTCGGGTGAGAGT-3’
CDKN1A	5’-GCAGACCAGCATGACAGATTT-3’	5’-GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA-3’
RB1	5’-GCAGTATGCTTCCACCAGGC-3’	5’-AAGGGCTTCGAGGAATGTGAG-3’
TP53	5’-GCCCCCAGGGAGCACTA-3’	5’-GGGAGAGGAGCTGGTGTTG-3’
GAPDH	5’-GCCCAATACGACCAAATCC-3’	5’-AGCCACATCGCTCAGACA-3’

- Εκτίμηση σχετικού μήκους τελομερών

Η εκτίμηση του σχετικού μήκους των τελομερών πραγματοποιήθηκε μέσω ημι-ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Απομονώθηκε γενωμικό DNA από P2, P6 και P10 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) (Pavlaki et al., 2012).

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^{o}C και έπειτα ακολουθούσαν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού 2 σταδίων (15sec στους 95^{o}C και 60sec στους 56^{o}C). Η αντίδραση της PCR με τους εκκινητές για τη β-σφαιρίνη (HBG1, HBG2) περιλάμβανε 1 κύκλο για 10 λεπτά στους 95^{o}C και ακολούθως 50 κύκλους πολλαπλασιασμού 2 σταδίων (15sec στους 95^{o}C και 60sec στους 58^{o}C). 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): $T/S=2^{-\Delta CT}$($\Delta CT=CT^{\text{τελομερούς}}-CT^{\beta\text{-σφαιρίνης}}$).

- Έλεγχος της επαγωγής της γήρανσης εκτιμώντας την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal)

Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος σχετικός δείκτης είναι η σχετιζόμενη με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάση (SA-β–gal). Το ένζυμο αυτό είναι μία λυσοσωμική υδρολάση, που είναι ενεργή στα νεαρά κύτταρα σε pH 4. Όμως στα γηρασμένα κύτταρα η υδρολάση αυτή είναι ενεργή και σε pH 6. Έτσι, μπορεί να αποτελέσει δείκτη γηρασμένων κυττάρων και να ανιχνευθεί με μία βιοχημική δοκιμασία. Πράγματι, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, το ποσοστό των θετικών για τη SA β–gal κυττάρων αυξάνεται με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και την ηλικία, αντίστοιχα (Dimri et al 1995). Η SA-β-gal φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αυξημένης λυσοσωμικής δραστηριότητας σε μη ιδανικό pH και γίνεται ανιχνεύσιμη στα γηρασμένα κύτταρα λόγω του αυξημένου λυσοσωμικού περιεχομένου τους (Gerland et al 2003). Η δοκιμασία βασίζεται στην παραγωγή μπλε ιζήματος, λόγω διάσπασης του χρωμογόνου υποστρώματος της X-gal.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Σε κάθε βοθρίο πλάκας καλλιεργειών 12 βοθρίων τοποθετήθηκαν 10000-20000 κύτταρα με 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Η πλάκα τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37ºC, 5% CO_2 και 95% υγρασίας, πραγματοποιούνταν πλήρης αλλαγή θρεπτικού δις εβδομαδιαίως και όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 50-60% της καλλιεργητικής επιφάνειας, περίπου σε 72 ώρες, γινόταν πλήρης αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου και ακολουθούσαν δυο πλύσεις με PBS.

Ακολουθούσε η μονιμοποίηση των κυττάρων για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με προσθήκη 1-2 ml διαλύματος αποτελούμενου από 2% φορμαλδεϋδη (vol/vol) (Lab-Scan, Analytical Sciences) και 0.2% γλουταραλδεϋδη (vol/vol) (Scharlau S.L) σε διάλυμα PBS. Ακολούθησαν δυο πλύσεις με 1-2 ml PBS ανά βοθρίο σε θερμοκρασία δωματίου συνοδευόμενες από ελαφρά ανάδευση για 30sec η καθεμιά.
Στη συνέχεια προστίθεντο 1-2 ml φρέσκου διαλύματος χρώσης SA-β-gal ανά βοθρίο Το διάλυμα χρώσης αποτελούνταν από 1 mg/ml X-gal (Applichem GmbH), 5 mM

$K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 150 mM sodium chloride, 2 mM magnesium chloride σε διάλυμα 40 mM citric acid/Na phosphate buffer (pH 6.0).

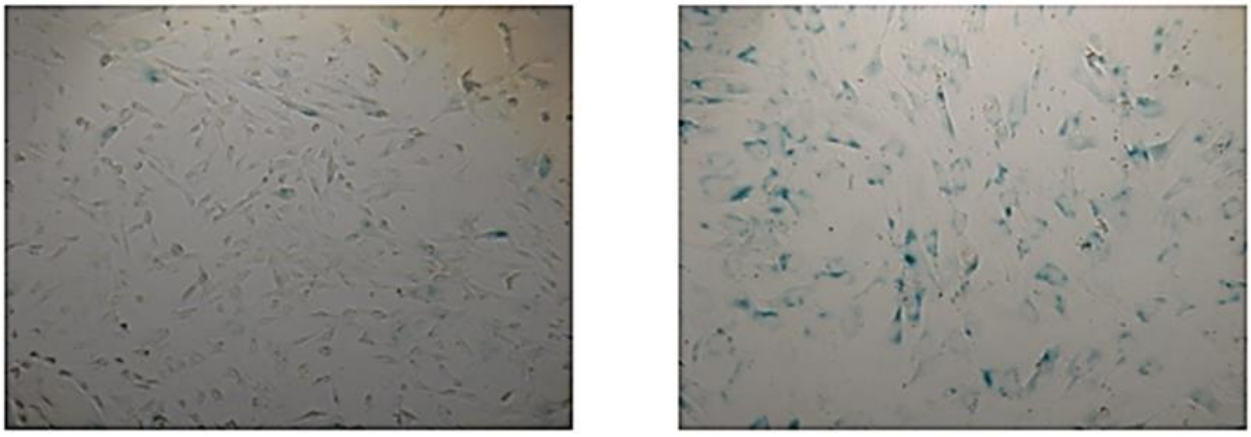
- Η πλάκα τοποθετείτο σε κλίβανο σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασίας 37^{o}C,απουσία υγρασίας.

Μετά από 12-16 ώρες επώασης πραγματοποιούνταν δυο πλύσεις με 1-2ml PBS ανά βοθρίο για 30sec. Τέλος, μετά την προσθήκη 1 ml απεσταγμένου νερού ανά βοθρίο γινόταν παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου με αντικειμενικό φακό 10X.

Τα σημασμένα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4^{o}C, στο σκοτάδι, με 70% γλυκερόλη (glycerol).

Η εκτίμηση του αριθμού των MSCs που εξέφραζαν την SA-β-gal (μπλε χρώση) γινόταν με μικροσκόπιο αναστροφής φάσης, σε 100 μετρούμενα MSCs [***Εικόνα 11***].

Η μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων που εξέφραζαν την SA-β-gal στα τρία βοθρία, αποτελούσε την τιμή έκφρασης SA-β-gal ανά δείγμα.



Εικόνα 11. *Έκφραση της SA-β-gal σε καλλιεργούμενα P10 WJ-MSCs (αριστερά) και BM-MSCs (δεξιά).*

Μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών του Wnt και του Κυτταρικού Κύκλου με PCR-Arrays

Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνει ένα σύνολο εκκρινόμενων πρωτεϊνικών μορίων που ενορχηστρώνουν και επηρεάζουν μια μυριάδα κυτταρικών βιολογικών και αναπτυξιακών διεργασιών, καθώς και τη μοίρα του εκάστοτε κυττάρου.

Ολικό RNA απομονωνόταν από P2 ανακαλλιέργειες ομφαλικών και μυελικών MSCs με τη χρήση του RNeasy Mini Kit.

Μελετήθηκε η έκφραση 84 γονιδίων που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος μέσω του μονοπατιού Wnt με τη χρήση Human Wnt Signalling Pathway RT^2 Profiler PCR Array [***Πίνακας 1***] σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (SABiosciences, Qiagen). Με παρόμοιο τρόπο, μελετήθηκε και η έκφραση 84 γονιδίων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας το Human Cell Cycle RT² Profiler™ PCR Array (SABiosciences, Qiagen) [***Πίνακας 2***].

Κατά τη μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού μελετήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται είτε θετικά είτε αρνητικά στον κυτταρικό κύκλο, ρυθμίζοντας την μετάβαση ανάμεσα σε κάθε φάση, τον πολλαπλασιασμό του DNA, τα σημεία ελέγχου και αναστολής του κυτταρικού κύκλου.

Η μεταβολή της έκφρασης (Fold Change, FC) καθενός γονιδίου στα ομφαλικά ως προς τα μυελικά MSCs, προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta CT=(2^{-\Delta CT\ WJ\text{-}MSC}) / (2^{-\Delta CT\ BM\text{-}MSC})$, και τουλάχιστον διπλάσια διαφορά στη γονιδιακή έκφραση ανάμεσα στην ομάδα των ομφαλικών και των μυελικών MSCs, θεωρείτο σημαντική.

Πίνακας 1. Γονίδια Human Wnt Signalling Pathway RT^2 Profiler PCR Array

	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
A01	AES	Amino-terminal enhancer of split
A02	APC	Adenomatous polyposis coli
A03	AXIN1	Axin 1
A04	AXIN2	Axin 2
A05	BCL9	B-cell CLL/lymphoma 9
A06	BTRC	Beta-transducin repeat containing
A07	CCND1	Cyclin D1
A08	CCND2	Cyclin D2
A09	CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1
A10	CSNK2A1	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide
A11	CTBP1	C-terminal binding protein 1
A12	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
B01	CTNNBIP1	Catenin, beta interacting protein 1
B02	CXXC4	CXXC finger protein 4

B03	DAAM1	Dishevelled associated activator of morphogenesis 1
B04	DAB2	Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)
B05	DIXDC1	DIX domain containing 1
B06	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
B07	DKK3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
B08	DVL1	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)
B09	DVL2	Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)
B10	EP300	E1A binding protein p300
B11	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11
B12	FBXW4	F-box and WD repeat domain containing 4
C01	FGF4	Fibroblast growth factor 4
C02	FOSL1	FOS-like antigen 1
C03	FOXN1	Forkhead box N1
C04	FRAT1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas
C05	FRZB	Frizzled-related protein
C06	FZD1	Frizzled family receptor 1
C07	FZD2	Frizzled family receptor 2
C08	FZD3	Frizzled family receptor 3
C09	FZD4	Frizzled family receptor 4
C10	FZD5	Frizzled family receptor 5
C11	FZD6	Frizzled family receptor 6
C12	FZD7	Frizzled family receptor 7
D01	FZD8	Frizzled family receptor 8
D02	FZD9	Frizzled family receptor 9
D03	GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha
D04	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
D05	JUN	Jun proto-oncogene
D06	KREMEN1	Kringle containing transmembrane protein 1
D07	LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
D08	LRP5	Low density lipoprotein receptor-related protein 5
D09	LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
D10	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8

D11	MMP7	Matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)
D12	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E01	NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
E02	NKD1	Naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
E03	NLK	Nemo-like kinase
E04	PITX2	Paired-like homeodomain 2
E05	PORCN	Porcupine homolog (Drosophila)
E06	PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
E07	PRICKLE1	Prickle homolog 1 (Drosophila)
E08	PYGO1	Pygopus homolog 1 (Drosophila)
E09	RHOA	Ras homolog gene family, member A
E10	RHOU	Ras homolog gene family, member U
E11	RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)
E12	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
F01	SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
F02	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17
F03	TCF7	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
F04	TCF7L1	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)
F05	TLE1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
F06	VANGL2	Vang-like 2 (van gogh, Drosophila)
F07	WIF1	WNT inhibitory factor 1
F08	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
F09	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1
F10	WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A
F11	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
F12	WNT16	Wingless-type MMTV integration site family, member 16
G01	WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2
G02	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B
G03	WNT3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3
G04	WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A
G05	WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
G06	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

G07	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
G08	WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6
G09	WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
G10	WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
G11	WNT8A	Wingless-type MMTV integration site family, member 8A
G12	WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination

Πίνακας 2. Γονίδια Human Cell Cycle Pathway RT² Profiler PCR Array

	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
A01	ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
A02	ANAPC2	Anaphase promoting complex subunit 2
A03	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
A04	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
A05	AURKA	Aurora kinase A
A06	AURKB	Aurora kinase B
A07	BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein
A08	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A09	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
A10	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
A11	BRCA2	Breast cancer 2, early onset
A12	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
B01	CCNA2	Cyclin A2
B02	CCNB1	Cyclin B1
B03	CCNB2	Cyclin B2
B04	CCNC	Cyclin C
B05	CCND1	Cyclin D1
B06	CCND2	Cyclin D2
B07	CCND3	Cyclin D3

B08	CCNE1	Cyclin E1
B09	CCNF	Cyclin F
B10	CCNG1	Cyclin G1
B11	CCNG2	Cyclin G2
B12	CCNH	Cyclin H
C01	CCNT1	Cyclin T1
C02	CDC16	Cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)
C03	CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
C04	CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
C05	CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
C06	CDC34	Cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)
C07	CDC6	Cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
C08	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
C09	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
C10	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
C11	CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
C12	CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
D01	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
D02	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
D03	CDK8	Cyclin-dependent kinase 8
D04	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
D05	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
D06	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
D07	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
D08	CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3
D09	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
D10	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
D11	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
D12	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
E01	CUL1	Cullin 1
E02	CUL2	Cullin 2
E03	CUL3	Cullin 3
E04	E2F1	E2F transcription factor 1
E05	E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
E06	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
E07	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1
E08	HUS1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)
E09	KNTC1	Kinetochore associated 1

E10	KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)
E11	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
E12	MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)
F01	MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2
F02	MCM3	Minichromosome maintenance complex component 3
F03	MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4
F04	MCM5	Minichromosome maintenance complex component 5
F05	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
F06	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
F07	MNAT1	Menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)
F08	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
F09	NBN	Nibrin
F10	RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)
F11	RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)
F12	RAD51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
G01	RAD9A	RAD9 homolog A (S. pombe)
G02	RB1	Retinoblastoma 1
G03	RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
G04	RBL1	Retinoblastoma-like 1 (p107)
G05	RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)
G06	SERTAD1	SERTA domain containing 1
G07	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
G08	STMN1	Stathmin 1
G09	TFDP1	Transcription factor Dp-1
G10	TFDP2	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
G11	TP53	Tumor protein p53
G12	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination

Επαλήθευση των αποτελεσμάτων των PCR Arrays

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων των PCR συστοιχιών (arrays), μελετήθηκαν γονίδια τα οποία είχαν σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ των δυο ομάδων που μελετήθηκαν.

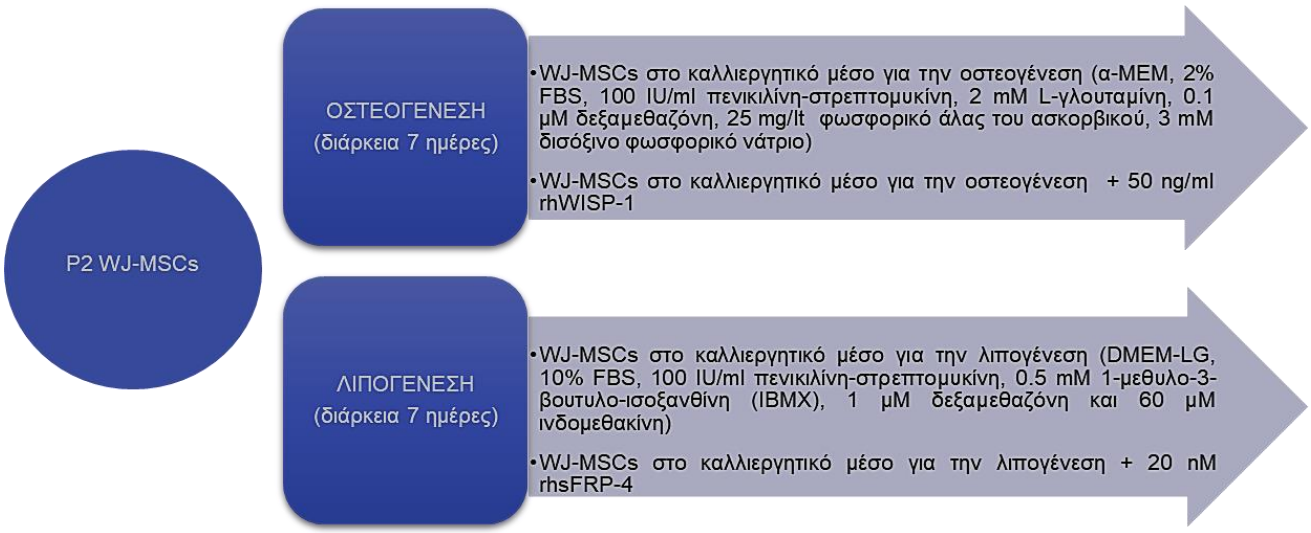
Η επαλήθευση έγινε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (SyBR GreenER qPCR Supermix) σε P2 WJ- και BM-MSCs, με τους ειδικούς εκκινητές των PCR-array για τα WISP1 (Wnt1 inducible signaling pathway protein 1), SFRP4 (Secreted frizzled-related protein 4) και GAPDH (εσωτερικό γονίδιο ελέγχου), και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκεύαστριας εταιρείας (SA Biosciences, Qiagen). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε Rotor-Gene 6000. Η αντίδραση της PCR αποτελούνταν από 40 κύκλους δυο σταδίων (15 δευτερόλεπτα στους 95^{o}C και 60 δευτερόλεπτα στους 60^{o}C). Στο τέλος κάθε κύκλου για την επιβεβαίωση της ειδικότητας κάθε αντίδρασης δημιουργούνταν μια καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) (62-95^{o}C).

Διερεύνηση του ρόλου δυο μορίων σχετιζόμενων με τα μονοπάτια του Wnt, του sFRP4 και του WISP1 στη διαφοροποίηση των WJ-MSCs

Σε μια ξεχωριστή σειρά πειραμάτων, P2 WJ-MSCs καλλιεργήθηκαν παρουσία ανασυνδυασμένης ανθρώπειας πρωτεΐνης WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (rhWISP1, R&D Systems) ή παρουσία της πρωτεΐνης secreted frizzled-related protein 4 (rhsFRP4, R&D Systems). Η διάλυση των πρωτεϊνών έγινε σε PBS, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, σε P2 WJ-MSCs που επρόκειτο να διαφοροποιηθούν προστέθηκαν 50 ng/ml rhWISP1 ή 20 nM rhsFRP4 στο καλλιεργητικό μέσο διαφοροποίησης για την οστεογένεση ή τη λιπογένεση, αντίστοιχα, για 7 ημέρες. Η έκφραση των WISP1 και sFRP4 μελετήθηκε τόσο στα αδιαφοροποίητα WJ-MSCs, όσο και στα διαφοροποιημένα WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα, αντίστοιχα [***Εικόνα 12***].

Σαν δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια P2 WJ-MSCs που διαφοροποιούνταν προς οστεοκύτταρα ή λιποκύτταρα απουσία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν δις εβδομαδιαίως.



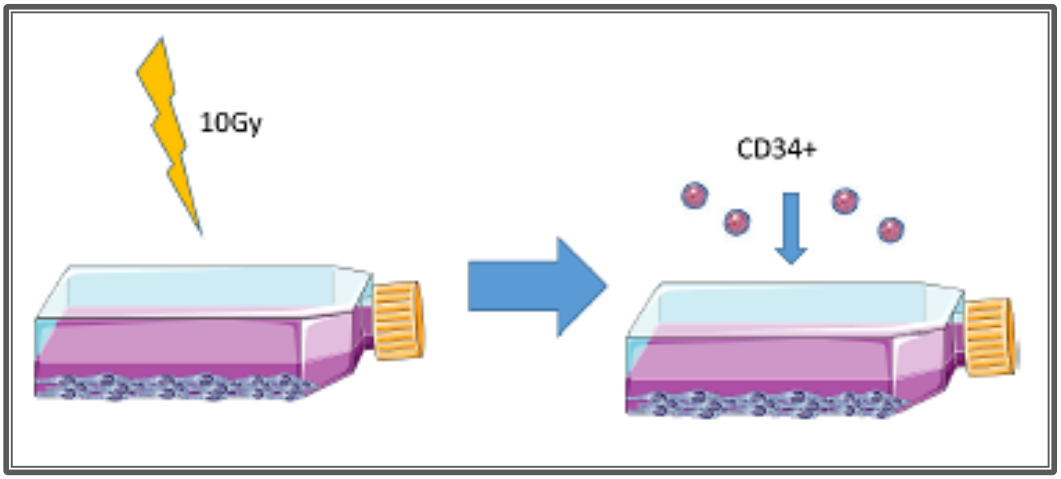
Εικόνα 12. *Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας για τη διερεύνηση του ρόλου των WISP1 και sFRP4 στην οστεογένεση και λιπογένεση των WJ-MSCs.*

Η διαφοροποίηση εκτιμήθηκε με ιστοχημικές χρώσεις και μέσω της έκφρασης γονιδίων σχετικών με τη λιπογένεση (PPARG, CEBPA) και την οστεογένεση (RUNX-2, ALP, OSC), όπως αναφέρεται παραπάνω. Ολικό RNA απομονώνονταν από P2 WJ-MSCs την ημέρα έναρξης της διαφοροποίησης καθώς και από διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία ή απουσία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Εκτιμήθηκε η έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση και λιπογένεση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, που περιγράφεται παραπάνω.

Εκτίμηση της ικανότητας των MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση.

Η ικανότητα των MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση μελετήθηκε σε μια διπλής-φάσης καλλιέργεια. Αρχικά γίνονταν συν-καλλιέργειες MSCs με $CD34^+$ κύτταρα και έπειτα βραχύχρονες κλωνογονικές καλλιέργειες (Coutinho, 1993; Papadaki et al., 2003).

Αναλυτικότερα, $CD34^+$ κύτταρα ομφαλοπλακουντιακού αίματος ή μυελού υγιών μαρτύρων απομονώνονταν με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) και ενοφθαλμίζονταν σε $25cm^2$ φλάσκες που περιείχαν κυτταρικούς «τάπητες» από WJ- και BM-MSCs. Οι «τάπητες» προηγουμένως είχαν ακτινοβοληθεί (10 Gy) για να σταματήσει ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός των MSCs [***Εικόνα 13***].



Εικόνα 13. *Ακτινοβόληση και συγκαλλιέργεια MSCs με CD34+ κύτταρα*

Τα CD34+ κύτταρα αραιώνονταν σε IMDM εμπλουτισμένου με 10% FBS, 100IU/ml penicillin/streptomycin. Οι συν-καλλιέργειες επωάζονταν στους 37ºC, 5% CO_2, σε περιβάλλον πλήρους υγρασίας, για διάστημα 3 εβδομάδων. Κάθε εβδομάδα αφαιρούνταν και ανανεωνόταν το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο κατά το ήμισυ και προσδιοριζόταν, για τα μη-προσκολλημένα στο πλαστικό αιμοποιητικά κύτταρα (non-adherent cells, NACs), η κλωνογονική ικανότητά τους, με βραχύχρονες μυελικές καλλιέργειες. Τα NACs καλλιεργούνταν εκ νέου σε βραχυχρονες καλλιέργειες κλωνογονικότητας (short term cultures – STC).

Συγκεκριμένα, για τις STC, τα NACs καλλιεργούνταν σε τριβλία Petri διαμέτρου 35mm (10.000 NACs / καλλιέργεια) με 1mL IMDM το οποίο είχε εμπλουτισθεί με 30% FBS, 1% BSA (bovine serum albumin, Gibco, Invitrogen), 10^{-4}M mercaptoethanol (Sigma), 0,075% sodium bicarbonate (Gibco, Invitrogen), 2mM L-glutamine (Sigma) και 0.9% methylcellulose (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) μαζί με 5 ng granulocyte-macrophage colony stimulating factor (G-MSCF, R&D Systems), 50 ng Interleukin-3 (IL-3, R&D Systems) και 2IU erythropoietin (EPO, Janssen-Ciliag, Athens, Greece).

Οι καλλιέργειες επωάζονταν για 14 ημέρες στους 37ºC, με 5% CO_2 , σε ατμόσφαιρα με πλήρη υγρασία. Την 14η ημέρα των βραχύχρονων αιμοποιητικών καλλιεργειών οι αποικίες προσμετρούνταν και κατηγοριοποιούνταν ως κοκκιοκυτταρικές (CFU-G), μακροφαγικές (CFU-M), μεικτές CFU (CFU-GM) και ερυθροκυτταρικές (CFU-E) σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια. Οι αποικίες τελικά χαρακτηρίζονταν ως μυελικές (CFU-G και CFU-M και CFU-GM), CFU-E και ως σύνολο (σύνολο CFU-GM και CFU-E).

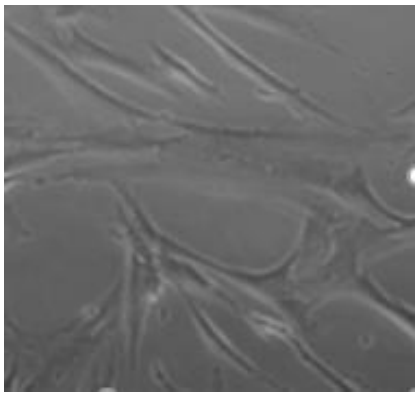
Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism Statistical PC program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).
Τα δεδομένα των ομάδων εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση και η σύγκριση μεταξύ τους έγινε με την μη-παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U test.
Η μέθοδος διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας (two-way analysis of variance) χρησιμοποιήθηκε για να ορισθούν οι διαφορές μεταξύ της ομάδας των WJ-MSCs και της ομάδας των BM-MSCs, όσον αφορά τον κυτταρικό χρόνο διπλασιασμού, την γονιδιακή έκφραση και τα επίπεδα κυτταροκινών κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών καθώς και του αριθμού των CFU από την καλλιέργεια των υπερκείμενων κυττάρων, και την οπτική απορρόφηση από μετρήσεις που ελήφθησαν από την MTT μέθοδο στην ανακαλλιέργεια P2.
Η δοκιμασία $\mathbf{x^2}$ (chi-square test) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των διαφορών μεταξύ των WJ-MSCs και BM-MSCs αναφορικά με τη συχνότητα κυτταρογενετικών διαταραχών στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

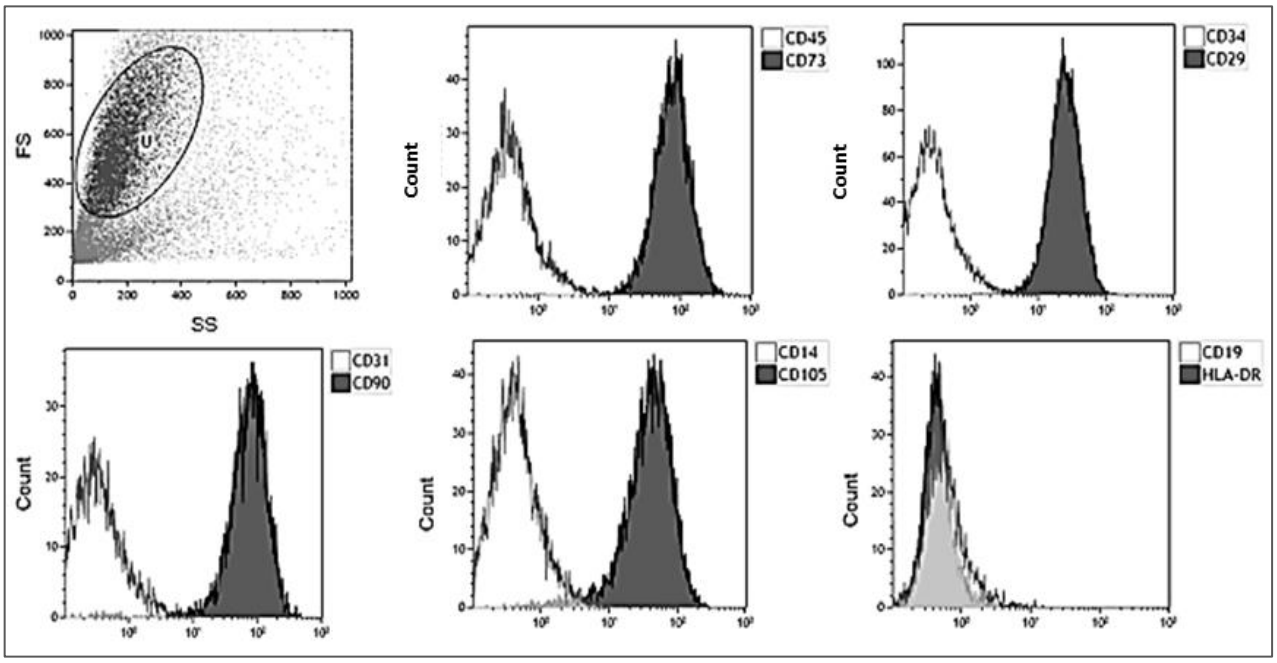
Τα BM-MSCs και WJ-MSCs παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά

BM-MSCs και WJ-MSCs απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν επιτυχώς για δέκα συνεχόμενες ανακαλλιέργειες (P). Τα MSCs χαρακτηρίζονταν από την τυπική ατρακτοειδή μορφολογία [***Εικόνα 14***] και η ανοσοφαινοτυπική τους ανάλυση στο τέλος κάθε ανακαλλιέργειας έδειξε πως, οι καλλιέργειες αποτελούνταν από έναν ομοιογενή πληθυσμό που εξέφραζε τα CD73, CD90, CD146, CD105, CD29, CD44 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 WJ- και BM-MSCs *[**Εικόνα 15**].*

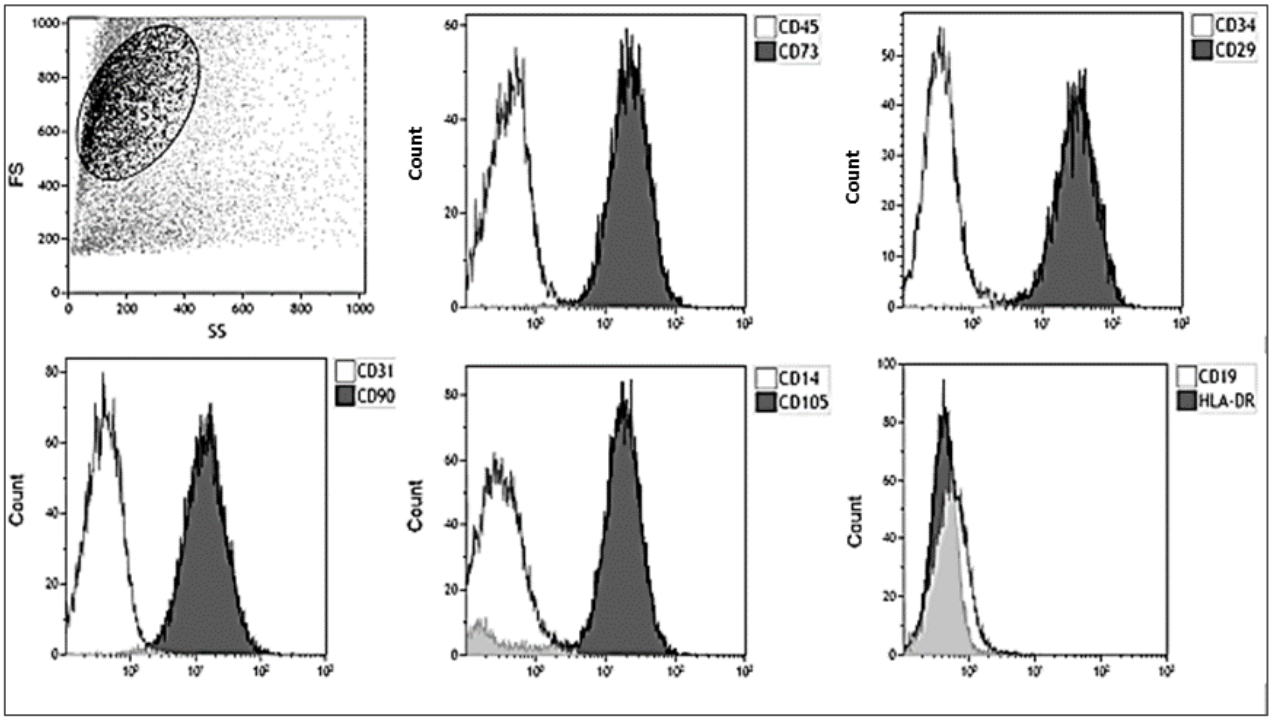


Εικόνα 14. *Τα καλλιεργούμενα BM-MSCs και WJ-MSCs χαρακτηρίζονταν από την τυπική ατρακτοειδή μορφολογία*

Εικόνα 15 – i



Εικόνα 15 - ii



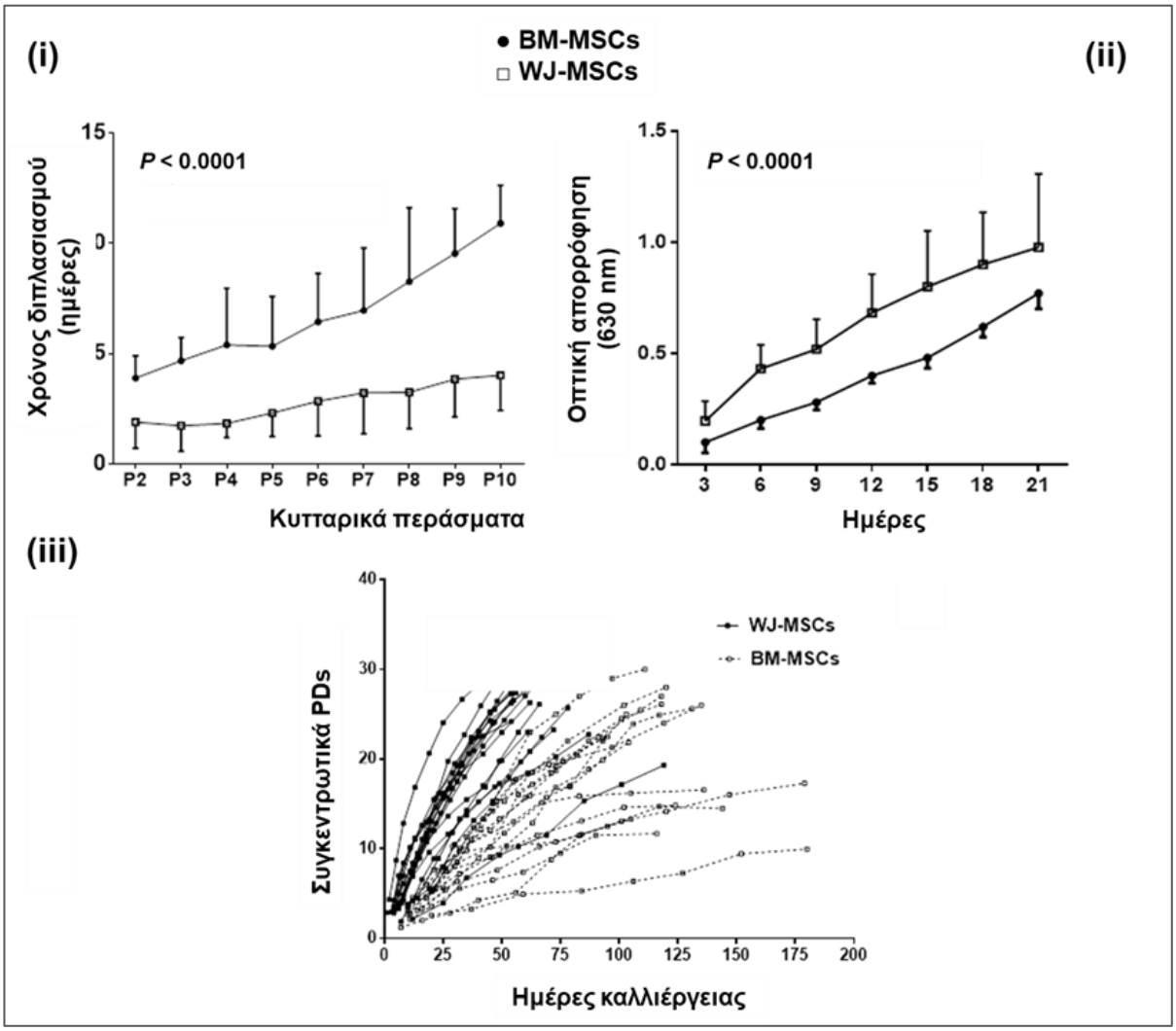
Εικόνα 15. *Ανοσοφαινότυπος καλλιέργούμενων MSCs στο P2. (i) Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση P2 BM-MSCs, (ii) Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση P2 WJ-MSCs.Οι καλλιέργειες MSCs και από τις δύο πηγές αποτελούνταν από ομοιογενή πληθυσμό που εξέφραζε τα CD73, CD90, CD105, CD29 αντιγόνα επιφανείας, αλλά όχι τους δείκτες CD31, CD19, CD45, CD14, CD34 και*

HLA-DR. Το ποσοστό έκφρασης του εκάστοτε αντιγόνου δεν παρουσίασε καμιά διαφορά μεταξύ των WJ- και BM-MSCs.

Τα BM-MSCs παρουσιάζουν μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα W-MSCs

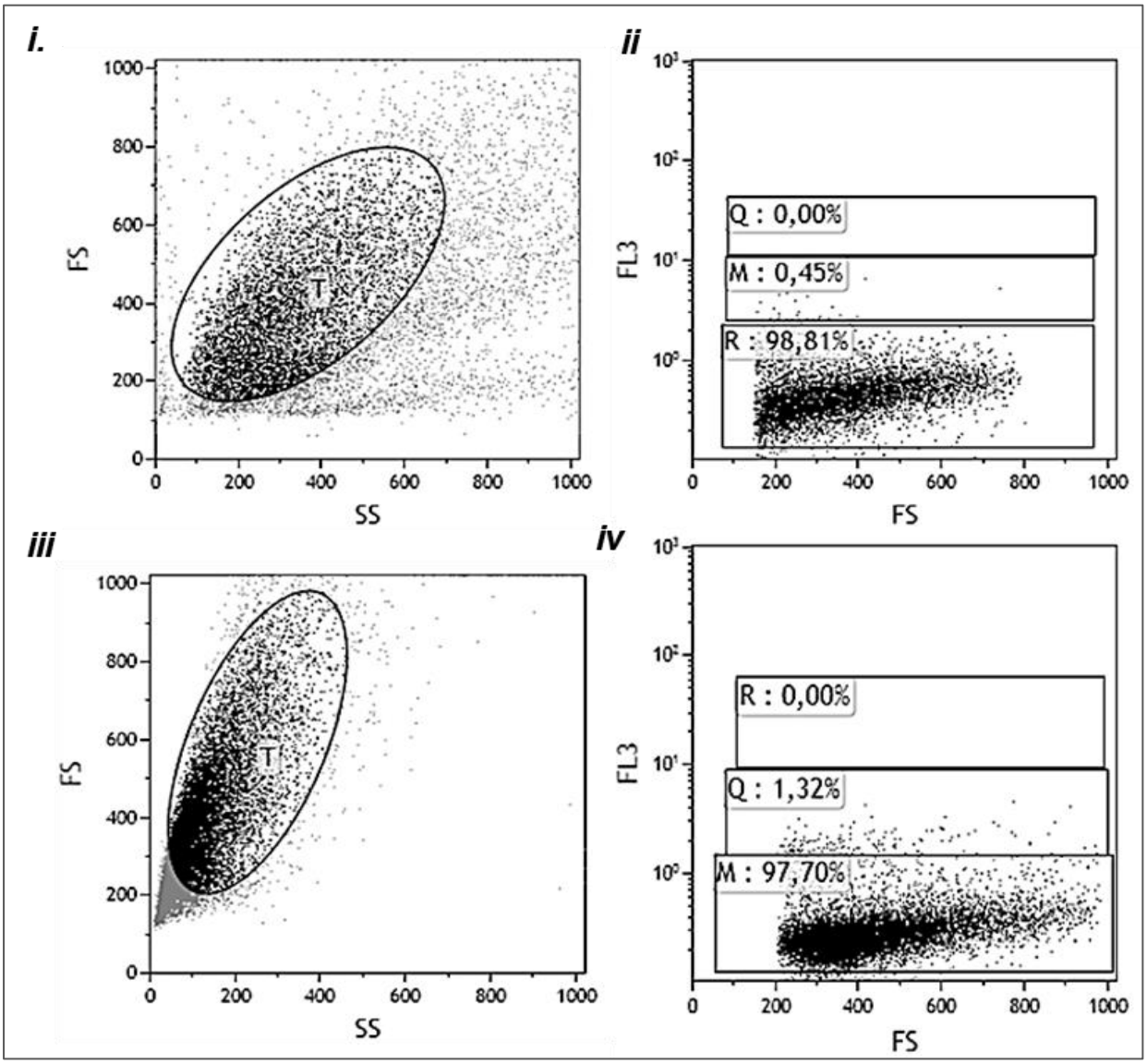
Τα BM-MSCs αναπτύσσονταν με σημαντικά βραδύτερο ρυθμό συγκριτικά με τα WJ-MSCs, στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών P2-P10 ($P < 0.0001$). Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην ***Εικόνα 16***, ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού σε ημέρες κυμαινόταν από 3.88 ± 1 (P2) έως 10.9 ± 1.7 (P10) στα BM-MSCs και από 1.88 ± 1.18 (P2) έως 4 ± 1.6 ημέρες στα WJ-MSCs (***Γράφημα 16-i***). 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 BM-MSCs ήταν σημαντικά μειωμένο στη διάρκεια μιας καλλιέργειας 21-ημερών σε σύγκριση με τα WJ-MSCs ($P < 0.0001$) (***Γράφημα 16-ii***). Ο βραδύτερος ρυθμός πολλαπλασιασμού των BM-MSCs έναντι των WJ-MSCs, φαίνεται ξεκάθαρα και από το γράφημα των μακροχρόνιων καμπύλων ανάπτυξης του καθενός δείγματος (***Γράφημα 16-iii***).

Εικόνα 16*. Τα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των BM-MSCs και WJ-MSCs.*
Το ***γράφημα*** *i) αναπαριστά το χρόνο διπλασιασμού (population doubling, PD) σε ημέρες (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση, SD) BM-MSCs (v = 18) and WJ-MSCs (v = 18) κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών (P). Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των MSCs στο τέλος κάθε ανακαλλιέργειας, συγκρίνομενος με τον αρχικό αριθμό τους. Το* ***γράφημα*** *ii) αναπαριστά την οπτική πυκνότητα (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση, SD) συναρτήσει του αριθμού των μεταβολικά ενεργών MSC-κυττάρων στο P2, στη διάρκεια μιας καλλιέργειας 21 ημερών χρησιμοποιώντας τη χρωμομετρική μέθοδο MTT. Το* ***γράφημα*** *iii) αναπαριστά τις μακροχρόνιες καμπύλες ανάπτυξης καθεμιάς BM-MSC και WJ-MSC καλλιέργειας. Κάθε κυτταρικό πέρασμα P, απεικονίζεται με ένα σημείο και ο αριθμός των συγκεντρωτικών PDs έχει υπολογιστεί με βάση το λόγο των καλλιεργούμενων κυττάρων στο τέλος κάθε ανακαλλιέργειας έναντι των αρχικών κυττάρων που εμβολιάστηκαν στην καλλιέργεια. Η σύγκριση ανάμεσα στα BM- και WJ-MSCs για το PD και το MTT, πραγματοποιήθηκε με την διπλή ανάλυση μεταβλητότητα (two-way analysis of variance).*



Τα BM-MSCs και WJ-MSCs εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά επιβίωσης

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον ρυθμό ανάπτυξης μεταξύ των BM- και WJ-MSCs οφείλονταν στα διαφορετικά χαρακτηριστικά επιβίωσής τους, εκτιμήθηκε το ποσοστό των αποπτωτικών MSCs με την 7AAD-χρώση στα P2 και P6 κυτταρικά περάσματα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των MSCs από τις δύο πηγές. Το συνολικό ποσοστό των αποπτωτικών κύτταρων, εκφραζόμενο ως το άθροισμα των 7-AAD ^{dim} και 7-AAD ^{bright} κυττάρων, ανάμεσα στα BM- και WJ-MSCs ήταν στο P2 8.42% ± 2.6% και 7.9% ± 1.92%, αντίστοιχα και στο P6 7.7% ± 4.66% και 6 ± 3.25%, αντίστοιχα [***Εικόνα 17***].



Εικόνα 17. *Χαρακτηριστικά επιβίωσης των MSCs.*

Για τη μελέτη της κυτταρικής απόπτωσης, MSCs από P1-P6 επωάστηκαν με 7-AAD και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής. Στο νεφελόγραμμα (ii) φαίνεται το ποσοστό των 7-AAD- ζωντανών κυττάρων (R), 7-AADdim πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (M) και 7-AADbright όψιμα αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων (Q) στο παράθυρο T (νεφελόγραμμα i), ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από P2 BM-MSCs. Ομοίως, στο νεφελόγραμμα (iv) φαίνεται το ποσοστό των 7-AAD- ζωντανών κυττάρων (M), 7-AADdim πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (Q) και 7-AADbright όψιμα αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων (R) στο παράθυρο T (νεφελόγραμμα iii), ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από P2 WJ-MSCs.

Διερεύνηση της κυτταρικής γήρανσης των MSCs

Με δεδομένο ότι η κυτταρική γήρανση σχετίζεται με ελαττωματική ικανότητα πολλαπλασιασμού, μελετήθηκε κατά πόσο τα καλλιεργηθέντα BM-MSCs ήταν πιο επιρρεπή σε αυτή συγκριτικά με τα WJ-MSCs. Για αυτό το λόγο, εκτιμήθηκαν η ενεργότητα της SA-β-gal, το μήκος των τελομερών και η έκφραση διαφόρων δεικτών που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση.

Όπως φαίνεται στον ***Πίνακα 3***, ο αριθμός των θετικών κυττάρων για τη χρώση SA-β-gal στα κυτταρικά περάσματα P2, P6 και P10 ήταν σημαντικά αυξημένος στα BM-MSCs συγκριτικά με τα WJ-MSCs (P = 0.0169, P = 0.0327 και P = 0.0001, αντιστοίχως).

Εις ό,τι αφορά το μήκος των τελομερών, φάνηκε πως μειωνόταν σταθερά στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών των MSCs και από τις δύο πηγές. Το μέσο μήκος των τελομερών τόσο των BM- όσο και των WJ-MSCs ήταν σημαντικά αυξημένο στο P2 συγκριτικά με το P10 (P = 0.0208 και P = 0.0002, αντιστοίχως) [***Πίνακας 3***]. Ωστόσο σε κανένα από τα P2, P6 και P10 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο μήκος των τελομερών μεταξύ των BM- και WJ-MSCs [***Πίνακας 3***], αποδεικνύοντας ότι το μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των BM-MSCs δεν μπορεί να αποδοθεί σε επιταχυνόμενη βράχυνση των τελομερών.

Ανακαλλιέργειες	**SA-β-gal θετικά κύτταρα (%)**			**Σχετικό μήκος των τελομερών**		
	WJ-MSCs	**BM-MSCs**	**P**	**WJ-MSCs**	**BM-MSCs**	**P**
P2	**10.28 ± 5,73**	**25.82 ± 17**	**0.0169**	**11,958 ± 1687**	**10,530 ± 2244**	**N.S.**
P6	**15.14 ± 9.73**	**39.33 ± 22.45**	**0.0327**	**10,128 ± 1317**	**8901 ± 870.9**	**N.S.**
P10	**24.09 ± 11**	**59.14 ± 15.69**	**0.0001**	**8529 ± 1619**	**8212 ± 1485**	**N.S.**

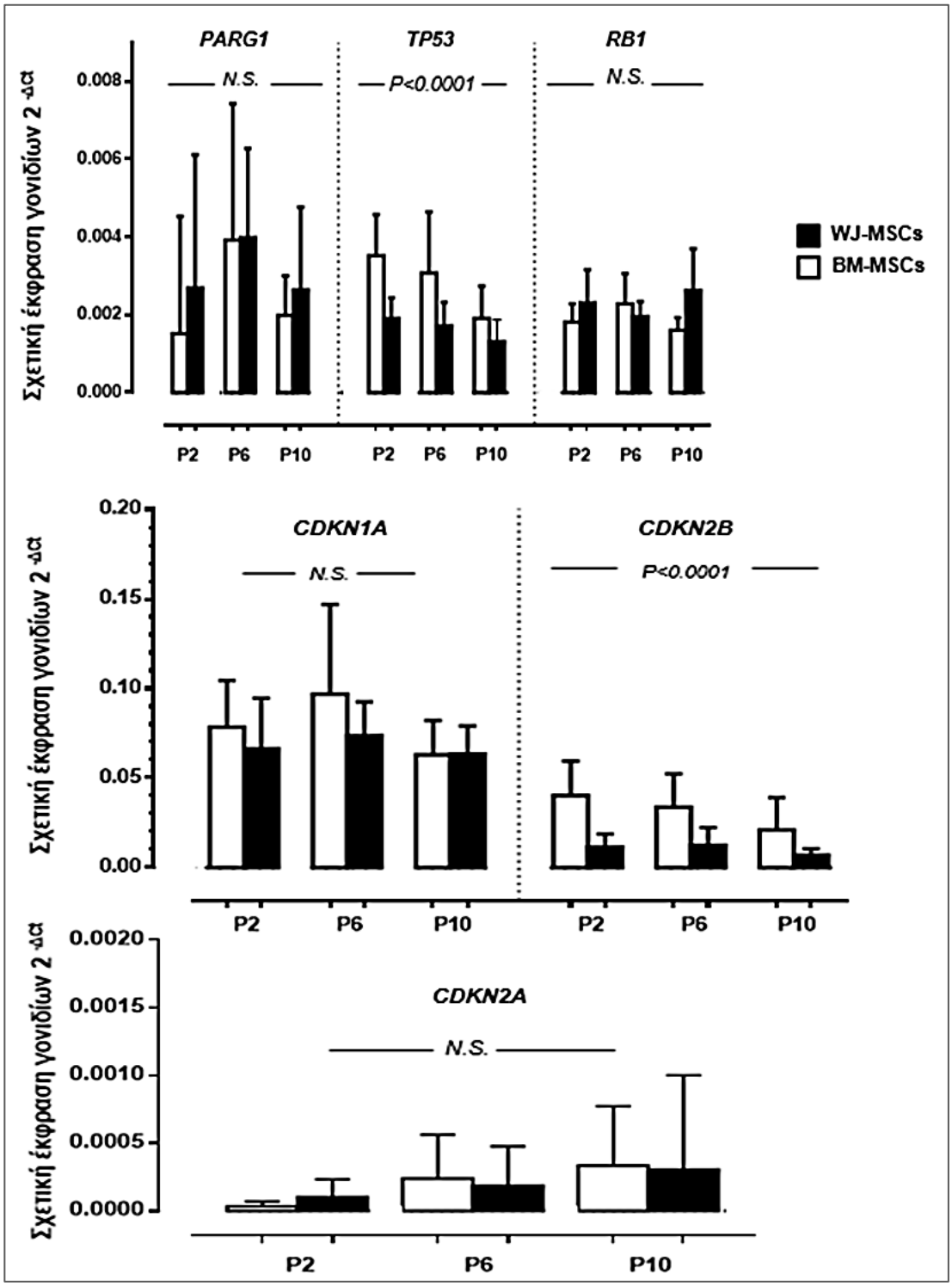
Πίνακας 3. *Χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης και σχετικό μήκος των τελομερών των BM-MSCs και WJ-MSCs.*

Η σύγκριση σε καθένα αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πέρασμα (P2,P6,P10) ανάμεσα στα BM-MSCs (n=18) και WJ-MSCs (n=18), 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.

Αναφορικά με τα γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση των PARG1, RB1, CDKN1A και CDKN2A μεταξύ των BM- και WJ-

MSCs στα P2, P6 και P10. Αντιθέτως, στα BM-MSCs παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση των γονιδίων CDKN2B και TP53 στα P2, P6 και P10 (P < 0.0001 και P < 0.0001, αντιστοίχως) [***Εικόνα 18***].

Λαμβάνοντας επομένως υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα, καθώς και το ότι η ενεργότητα της SA-β-gal δεν αποτελεί αίτιο, αλλά ούτε και είναι απαραίτητη για την ανάδειξη της κυτταρικής γήρανσης, θεωρούμε πως η μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των BM-MSCs συγκριτικά με τα WJ-MSC δε οφείλεται στην πρώιμη κυτταρική γήρανση των BM-MSCs.



Εικόνα 18. *Έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την κυτταρική γήρανση στα BM-MSCs και WJ-MSCs. Τα ραβδογραμματα αναπαριστούν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση, SD) των σχετιζόμενων με τη γήρανση γονιδίων PARG1, TP53, RB1, CDKN1A, CDKN2A, και CDKN2B στα BM-MSCs (n = 18) και στα WJ-MSCs (n = 18) στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών (P).*

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς (με τη μέθοδο : 2-ΔCt).Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας συγκρίνοντας τις πολλαπλές μέσες τιμές σε αντιπροσωπευτικά κυτταρικά περάσματα P2-P6-P10.

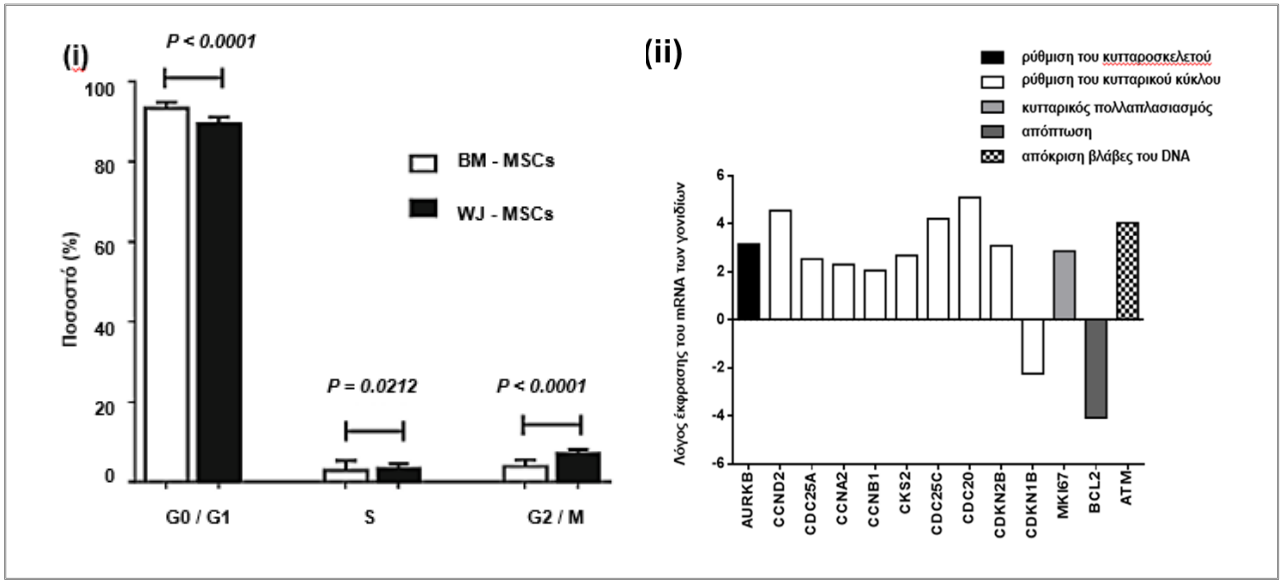
Υπερέκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου στα WJ-MSCs

Μελετώντας περαιτέρω τις διαφορές στο δυναμικό πολλαπλασιασμού μεταξύ των BM-MSCs και των WJ-MSCs, διερευνήθηκε η κατανομή των καλλιεργούμενων κυττάρων στις επιμέρους φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Από τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου διαπιστώθηκε πως στο P2 σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός καλλιεργούμενων BM-MSCs βρισκόταν «δεσμευμένος» στη φάση G1 (quiescent phase) συγκριτικά με τα WJ-MSCs (93.25 ± 1.63% και 89.54 ± 1.45%, αντιστοίχως, $P < 0.0001$) [***Εικόνα 19-i***].Από την άλλη μεριά, το ποσοστό των BM-MSCs στις φάσεις S και G2/M ήταν μικρότερο (2.9 ± 2.4% και 3.85 ± 1.66%, αντιστοίχως) σε σχέση με τα αντίστοιχα WJ-MSCs (3.34 ± 1.27% και 7.11 ± 0,98%, αντιστοίχως), και μάλιστα με στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0212$ και $P < 0.0001$, αντίστοιχα) [***Εικόνα 19-i***].

Εμβαθύνοντας στη μελέτη του κυτταρικού κύκλου ώστε να διερευνηθεί η διαφορετική κατανομή των BM- και WJ-MSCs στις διάφορες φάσεις του, εκτιμήθηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο με PCR arrays [***Εικόνα 19-ii***].

Ως σημαντική διαφορά της έκφρασης γονιδίων μεταξύ της ομάδας των WJ-MSCs και των BM-MSCs θεωρήθηκε η μεταβολή (Fold Change – FC) της γονιδιακής έκφρασης κατά δύο φορές τουλάχιστον.



Εικόνα 19. *Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και η σχετική έκφραση των σχετιζόμενων γονιδίων με τον κυτταρικό κύκλο στα WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs.*

i. P2 WJ-MSCs και BM-MSCs, βάφτηκαν με ιωδιούχο προπίδιο και χαρακτηρίστηκαν ως προς την κατανομή τους στον κυτταρικό κύκλο με κυτταρομετρία ροής. Τα ραβδογράμματα παριστούν το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου και οι τιμές αναπαρίστανται ως η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση σε 18 ανεξάρτητα πειράματα.

ii. Τα ραβδογράμματα αναπαριστούν το λόγο έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο στα P2 WJ-MSCs (n = 6), σε σχέση με τα αντίστοιχα BM-MSCs (n = 6), χρησιμοποιώντας ένα array αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR array). Ο λόγος έκφρασης για κάθε γονίδιο ανάμεσα στην ομάδα των WJ-MSCs και των BM-MSCs υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΔΔCt. Στο γράφημα απεικονίζονται μόνο τα γονίδια που είχαν τουλάχιστον δύο φορές μεταβολή της έκφρασης μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs.

Τα μελετόμενα γονίδια έχουν κατανεμηθεί ανάλογα με την εμπλοκή τους σε ειδικές κυτταρικές διεργασίες όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η απόκριση σε βλάβες του DNA.

Τα γονίδια κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τη λειτουργία τους ως σχετιζόμενα με τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [***Εικόνα 19-ii***].

Βρέθηκε λοιπόν πως η έκφραση 13 από τα 84 γονίδια του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν διέφερε μεταξύ των δυο MSC πληθυσμών στο P2. Ειδικότερα, στα P2 WJ-MSCs παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου AURKB (aurora kinase B; FC = 3.1), σε σχέση με τα P2 BM-MSCs. Πρόκειται για ένα γονίδιο του οποίου η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη λειτουργία των μικροσωληνίσκων κατά την κίνηση και τον

διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, συνδέοντας το μιτωτικό άξονα με το κεντρομερές. Επιπλέον, στα WJ-MSCs παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων CCND2 και CDC25A, σε σχέση με τα BM-MSCs (cyclin D2; FC = 4.5 και cell division cycle 25; FC = 2.5, αντιστοίχως). Και τα δυο γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μετάβασης από τη φάση G1 στην S του κύκλου. Ακόμα η έκφραση ποικίλων γονιδίων, που κωδικοποιούν για ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου σχετιζόμενων με τη μετάβαση από τη φάση G2 στην M, βρέθηκε αυξημένη στα WJ-MSCSs. Πρόκειται για τα γονίδια CCNA2 (FC = 2.3), το CCNB1 (FC = 2.0) – γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που προσδένεται στην καταλυτική υπομονάδα μια κυκλο-εξαρτώμενης κινάσης (CDC28 protein kinase regulatory subunit 2, CKS2; FC = 2.6), το CDC25C – ενεργοποιητής μιας κυκλο-εξαρτώμενης κινάσης (cell division cycle 25C; FC = 4.2) και το γονίδιο που CDC20 (cell division cycle protein 20; FC = 5), το οποίο έχει ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορα σημεία του κύκλου, όπως στην πυρηνική κίνηση πριν από την αναφάση και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων.

Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου MKI67, που κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, ήταν αυξημένη στα WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs (FC = 2.8). Αντιθέτως, το αντι-αποπτωτικό γονίδιο BCL2, το οποίο μεσολαβεί στην καθυστέρηση της μετάβασης στη φάση S, ήταν σημαντικά μειωμένο στα WJ-MSCs συγκριτικά με τα BM-MSCs (FC = - 4), όπως και το γονίδιο CDKN1B, του αναστολέα μιας κυκλο-εξαρτώμενης κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; FC = -2.2), το οποίο αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1.

Επιπροσθέτως, στα WJ-MSCs παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων CDKN2B (FC = 3.08) και ATM (ataxia-telangiectasia mutated gene; FC = 4.03) σε σχέση με τα BM-MSCs. Το μεν CDKN2B μεσολαβεί στην αναστολή της φάσης G1, το δε ATM συμμετέχει στην καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου ύστερα από κάποια βλάβη στο DNA.

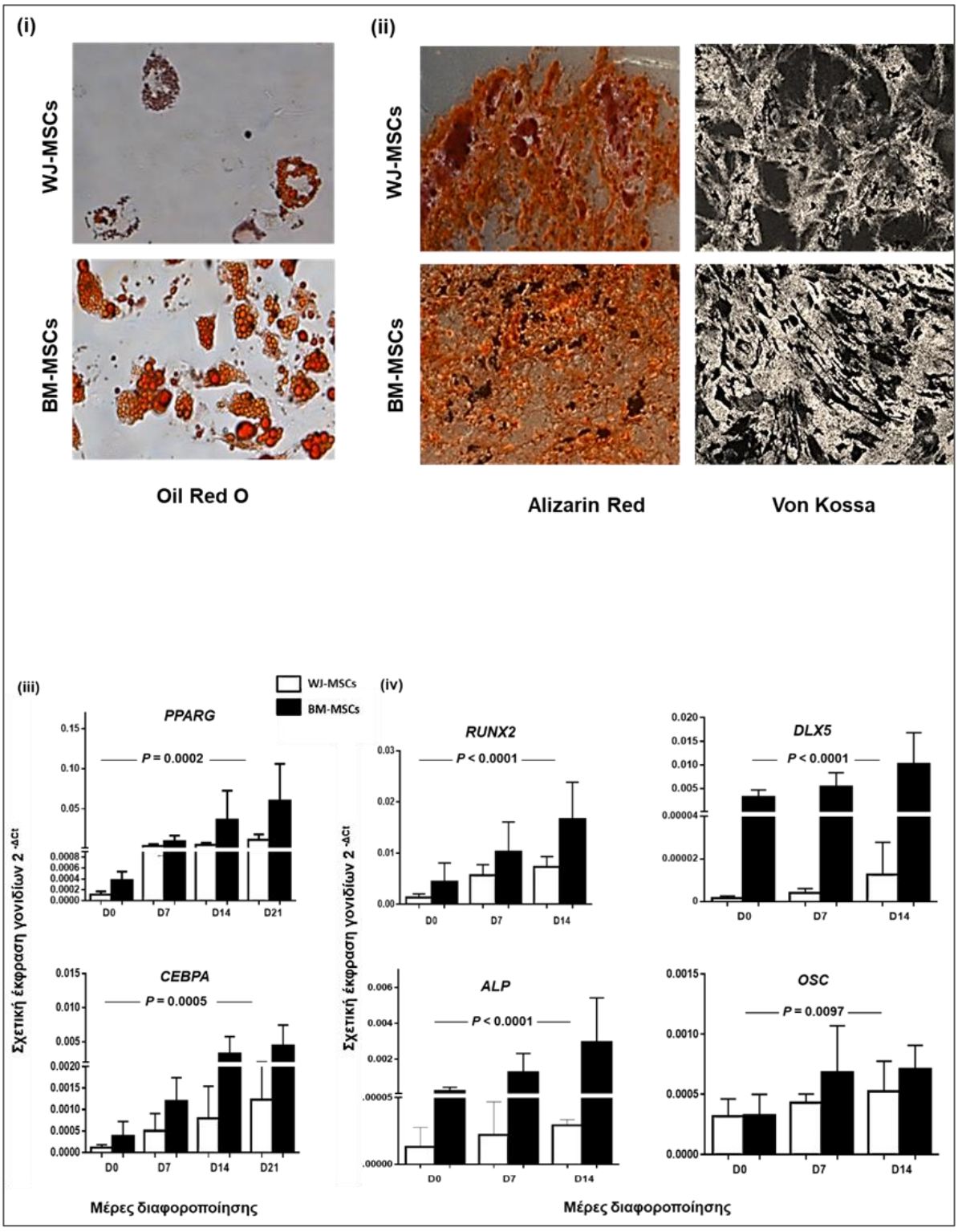
Συμπερασματικά τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πως τα WJ-MSCs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση γονιδίων που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ συγχρόνως εμφανίζουν μειωμένη έκφραση για τα γονίδια που σχετίζονται με αναστολή του κυτταρικού κύκλου, συγκριτικά με τα αντίστοιχα BM-MSCs.

Το μειωμένο οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs

Για να συγκρίνουμε το δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs και των BM-MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, πραγματοποιήθηκε συγχρόνως διαφοροποίηση προς τη λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα σε P2 MSCs και από τις δυο πηγές. Η ικανότητα των MSCs να διαφοροποιούνται προς τις σειρες αυτές εκτιμήθηκε με κατάλληλες ιστοχημικές χρώσεις, αλλά και με τη μελέτη της έκφρασης ειδικών γονιδίων σχετιζόμενων με την λιπογένεση και την οστεογένεση [***Εικόνα 20]***.

Τα WJ-MSCs παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα συγκριτικά με τα BM-MSCs, όπως τεκμηριώθηκε από τη χρώση με Oil Red O [***Εικόνα 20-i]***, αλλά και από την ελαττωμένη έκφραση των γονιδίων PPARG και CEBPA (P = 0.0002 και P = 0.0005, αντιστοίχως) - δύο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων της λιπογένεσης - κατά η διάρκεια της διαφοροποίησης [***Εικόνα 20-iii].***

Τα WJ-MSCs δεν διέφεραν ποιοτικά ως προς την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα συγκριτικά με τα BM-MSCs, όπως έδειξαν οι χρώσεις Alizarin Red και Von Kossa, εμφανίζοντας παρόμοια επίπεδα αλατοποίησης της εξωκυττάριας ουσίας [***Εικόνα 20-ii]***. Ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RUNX2, DLX5, ALP και OSC, ήταν σημαντικά μειωμένα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα συγκριτικά με τα BM-MSCs (P < 0.0001, P < 0.0001, P < 0.0001 και P = 0.0097,αντιστοίχως) [***Εικόνα 20-iv].*** Μάλιστα είναι ενδιαφέρον πως τα αδιαφοροποίητα P2 WJ-MSCs εκφράζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα των γονιδίων PPARG,CEBPA,RUNX2, DLX5 και ALP σε σχέση με τα αντίστοιχα BM-MSC (P = 0.0002, P = 0.0281, P = 0.0141, P < 0.0001 και P < 0.0001, αντίστοιχα). Τα παραπάνω δεδομένα συγκλίνουν στο συμπέρασμα πως τα WJ-MSCs εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης τόσο ως προς λιποκύτταρα όσο και ως προς οστεοκύτταρα σε σχέση με τα BM-MSCs.



Εικόνα 20*. Διαφοροποίηση των WJ-MSCs και των BM-MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα.*

Η ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs και των BM-MSCs προς λιποκύτταρα εκτιμήθηκε μέσω της χρώσης Oil Red O και της έκφρασης ειδικών για τη λιπογένεση γονιδίων, μέσω της

*αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η ειδική για τα λιπιδικά κυστίδια χρώση **(i)** υποδεικνύει το μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα συγκριτικά με τα αντίστοιχα BM-MSCs. Τα γραφήματα **(iii)** απεικονίζουν τη σχετική έκφραση (η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων PPARG και CEBPA στα BM-MSCs (n = 18) και στα WJ-MSCs (n = 18), πριν την έναρξη της διαφοροποίησης (ημέρα 0) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία στη διάρκεια της διαφοροποίησης.*

*Η ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs και των BM-MSCs προς οστεοκύτταρα εκτιμήθηκε μέσω των χρώσεων Alizarin Red και Von Kossa και της έκφρασης ειδικών για τη οστεογένεση γονιδίων, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Οι ειδικές χρώσεις **(ii)** των οστεοκύτταρων δεν δείχνουν κάποια διαφορά μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs ως προς την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από τους δυο MSC πληθυσμούς.*
*Τα γραφήματα **(iv)** απεικονίζουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων RUNX2, DLX5, ALP και OSC στα BM-MSCs (n = 18) και στα WJ-MSCs n = 18), πριν την έναρξη της διαφοροποίησης (ημέρα 0) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία στη διάρκεια της διαφοροποίησης.*
Η ανάλυση της έκφρασης όλων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς (με τη μέθοδο : $2^{-\Delta Ct}$).Η εικονιζόμενη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω αμφίδρομης ανάλυσης διακύμανσης.

Διαφορετικό προφίλ έκφρασης των μορίων του WNT σηματοδοτικού μονοπατιού μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs.

Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμού των MSCs (Ling et al., 2009). Προκειμένου λοιπόν να μελετηθούν περαιτέρω τα βιολογικά χαρακτηριστικά των WJ-MSCs και BM-MSCs συγκρίναμε το προφίλ της έκφρασης γονιδίων του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού στους ανωτέρω πληθυσμούς.
Με PCR array εκτιμήθηκε η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι του Wnt και διαπιστώθηκε ότι 25 από τα 84 σχετιζόμενα γονίδια ήταν τουλάχιστον δύο φορές αυξημένα είτε στα WJ-MSCs είτε στα BM-MSCs [***Εικόνα 21-i***].
Πιο συγκεκριμένα, 5 γονίδια που κωδικοποιούν Wnt-πρωτεΐνες ήταν σημαντικά μειωμένα στα WJ-MSCs (WNT3A, FC = -2.4; WNT5A, FC = -2.3; WNT5B, FC = -3.4; WNT7B, FC = -2.6; WNT8A, FC = -2.2). Επίσης η έκφραση 4 γονίδιων που κωδικοποιούν WNT-υποδοχείς ήταν σημαντικά μειωμένη στα WJ-MSCs (FZD1, FC = - 4; FZD3, FC = -11.4; FZD4, FC = -5.4; FZD5, FC = -3.2). Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης 2 γονίδιων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο κανονικό Wnt μονοπάτι ήταν μειωμένα (AXIN, FC = -2.6 και PORCN1, FC = -2.4), ενώ 2 γονίδια

που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του μη-κανονικού μονοπατιού (disheveled-associated activator of morphogenesis 1- DAAM1, FC = 2.9; Vang-like 2 - VANGL2, FC = 5.6) ήταν αυξημένα στα WJ-MSCs. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αναστολέα του κανονικού Wnt- μονοπατιού, DKK1 (Dickkopf-1) ήταν σημαντικά αυξημένο στα WJ-MSCs (FC = 7.3) σε σχέση με τα BM-MSCs, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τους αρνητικούς Wnt-ρυθμιστές FRZB, sFRP1 και sFRP4 ήταν μειωμένα στα WJ-MSCs (FC = -4.6; FC = -2.5; FC = -36.2, αντιστοίχως). Ακόμα στα WJ-MSCs παρατηρήθηκε να είναι σημαντικά μειωμένη η έκφραση των γονιδίων-στόχων του κανονικού Wnt-μονοπατιού, DIX domain containing 1, transcriptional factor-7, forkhead box protein N1, matrix matelloproteinase-7 και WNT1 inducible signaling pathway (DIXDC1, FC = -2.6; TCF7, FC = -2.1; FOXN1, FC = -2.1; MMP7, FC = -2.2; και WISP-1, FC = -22, αντιστοίχα). Αντιθέτως, η έκφραση του CCND2 και του ενεργοποιητή τού Pituitary homeobox 2 (PITX2), που κωδικοποιούν επίσης στόχους του κανονικού Wnt-μονοπατιού ήταν σημαντικά αυξημένη (FC = 3; και FC = 2.7, αντίστοιχα).

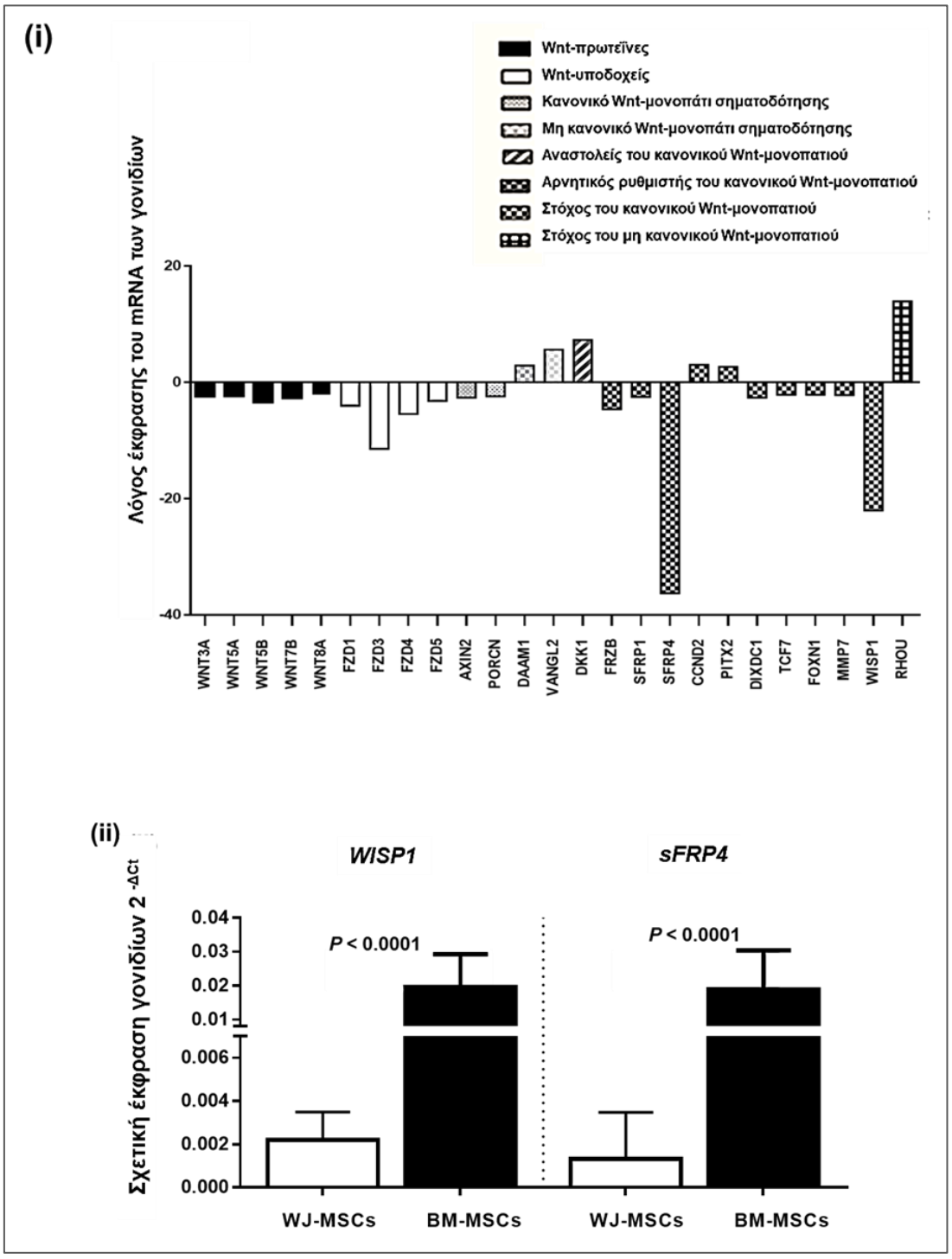
Τέλος, η έκφραση του γονιδίου Ras Homolog Family Member U (RHOU), που αποτελεί στόχο του μη-κανονικού Wnt μονοπατιού ήταν αυξημένη (FC = 13.9) στα WJ-MSCs.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα φανερώνουν πως η σηματοδότηση μέσω του κανονικού μονοπατιού Wnt είναι μειωμένη στα WJ-MSCs. Αυτό φάνηκε από τη μειωμένη έκφραση πολλών γονιδίων σχετιζόμενων με το εν λόγω μονοπάτι, γονιδίων-στόχων του μονοπατιού, αλλά και από την υπερέκφραση του αναστολέα της σηματοδότησης του μονοπατιού μέσω του άξονα Wnt/β-catenin, του DKK1. Από την άλλη μεριά, η αυξημένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μη-κανονικό Wnt μονοπάτι σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση του γονιδίου-στόχου RHOU του μη-κανονικού μονοπατιού, συνηγορούν υπέρ της ενεργοποίησης του εν λόγω μονοπατιού στα WJ-MSCs.

Θεωρήσαμε λοιπόν πως η μειωμένη έκφραση των αναστολέων/αρνητικών ρυθμιστών του Wnt μονοπατιού, sFRP1, FRZB (sFRP3), sFRP4 και AXIN2, ίσως να αποτελεί ένα αντιρροπιστικό φαινόμενο ενισχύοντας την σηματοδότηση/διέγερση μέσω του κανονικού Wnt μονοπατιού. Μάλιστα το γεγονός αυτό είναι ίσως αναμενόμενο, καθώς τα σήματα μέσω του κανονικού Wnt μονοπατιού ανταγωνίζονται εκείνα μη κανονικού και αντίστροφα (Lien et al., 2014).

Για την επιβεβαίωση των ευρημάτων της ανάλυσης του PCR array, εκτιμήθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου τα επίπεδα mRNA των δύο γονιδίων με τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση μεταξύ WJ-MSC (n = 18) και BM-MSC (n = 18) στο P2, δηλαδή των WISP-1 και sFRP4. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από το PCR array, ο μέσος όρος έκφρασης των WISP-1 και sFRP4

ήταν σημαντικά μειωμένος στα WJ-MSCs (0.0022 ± 0.0013 και 0.0013 ± 0.002, αντίστοιχα; P<0.0001) σε σχέση με τα BM-MSCs (0.019 ± 0.009 και 0.018 ± 0.01, αντιστοίχως; P<0.0001) [***Εικόνα 21-ii***].



Εικόνα 21. i) *Σχετική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο WNT-σηματοδοτικό μονοπάτι στα WJ-MSCs και στα BM MSCs.Οι στήλες του γραφήματος αναπαριστούν τη μεταβολή (fold*

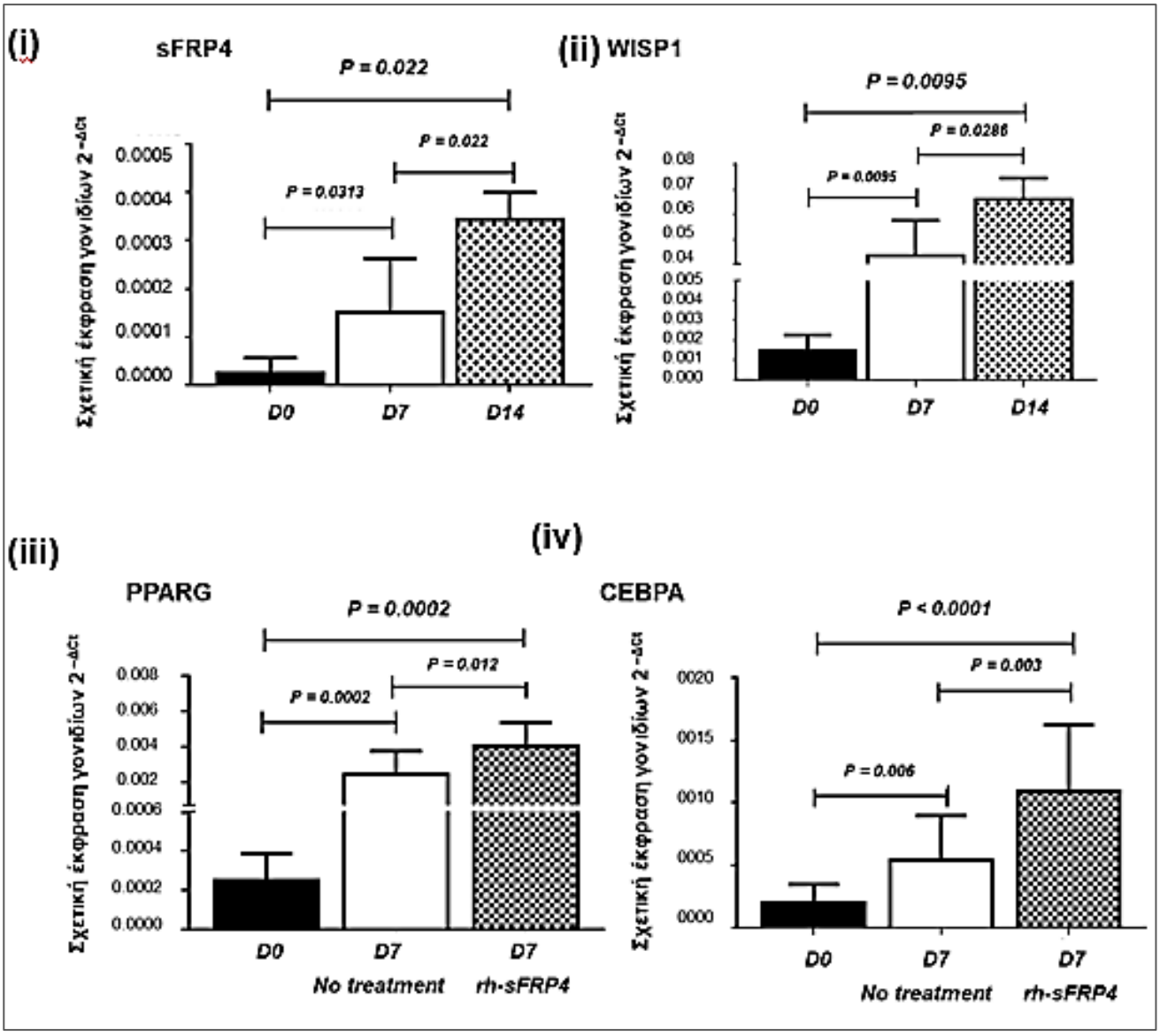
change–FC) της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt, σε P2 WJ-MSCs (n=6), σε σύγκριση με BM-MSCs (n=6) με τη χρήση real time PCR array. Στο γράφημα απεικονίζονται μόνο τα γονίδια που είχαν τουλάχιστον 2-φορές μεταβολή της έκφρασής τους στα WJ-MSCs και στα BM MSCs. ***ii)*** *Επιβεβαίωση των ευρημάτων της ανάλυσης του PCR array. Οι στήλες απεικονίζουν τη σχετική mRNA έκφραση των γονιδίων WISP1 και sFRP4 στα WJ-MSCs (n = 18) και στα BM-MSCs (n = 18) στο P2 χρησιμοποιώντας των αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς (με τη μέθοδο :* $2^{-\Delta Ct}$*). Η σύγκριση στα BM-MSCs και WJ-MSCs , πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μη-παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U. Αναγράφονται οι τιμές P στατιστικής σημαντικότητας και τα δεδομένα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση.*

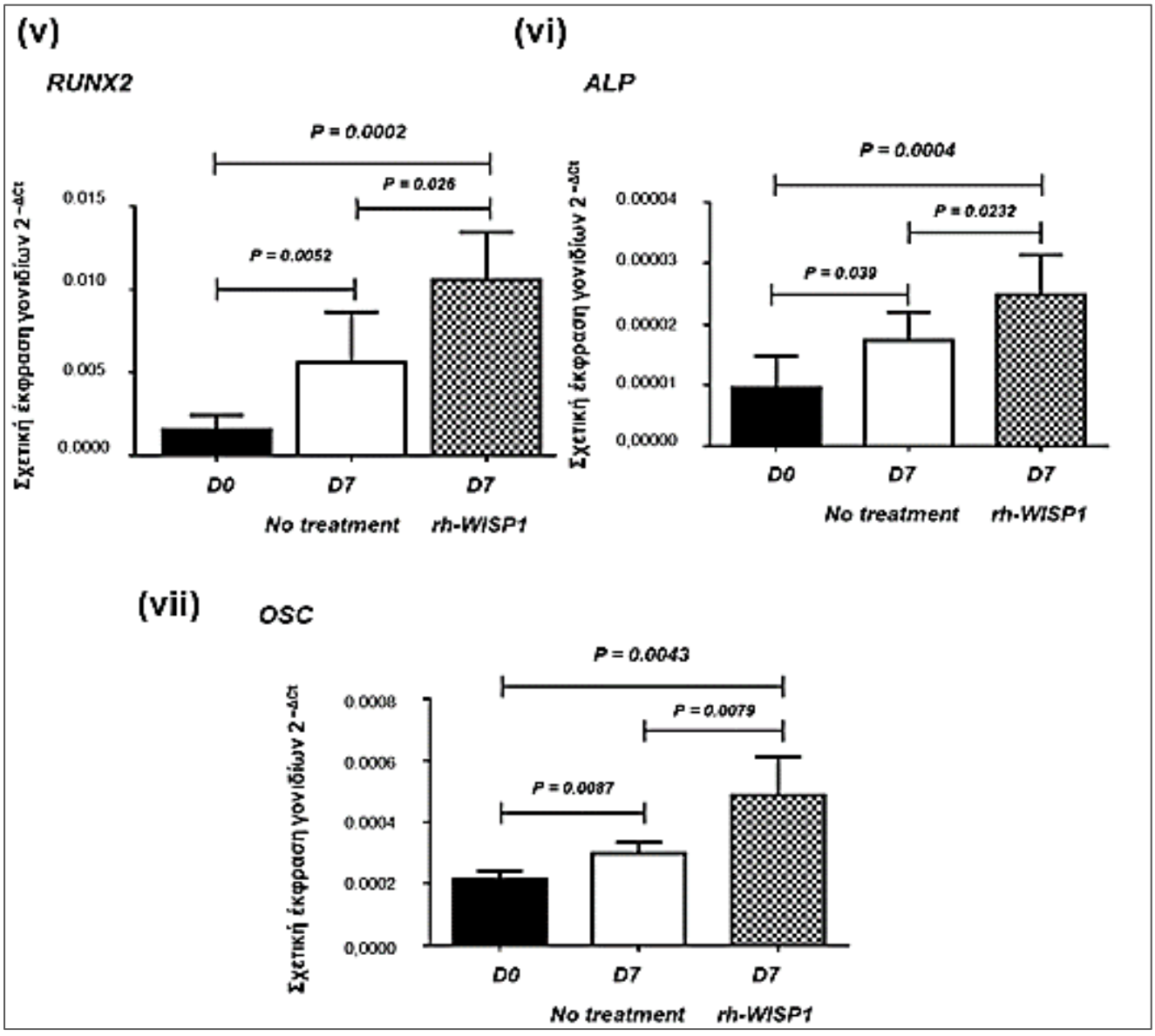
Το sFRP4 ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα

Η εκκρινόμενη sFRP4 πρωτεΐνη (secreted frizzled-related protein 4) είναι ένας αναστολέας των WNT πρωτεϊνών, που ανταγωνίζεται τόσο το κανονικό όσο και το μη-κανονικό WNT μονοπάτι (Kawano Y et al., 2003). Έχει αποδειχτεί πως η ανασυνδιασμένη ανθρώπινη (recombinant human, rh) πρωτεΐνη sFRP4 (rh-sFRP4) επάγει την *in vitro* λιπογένεση των MSCs από το λιπώδη ιστό. Διερευνήσαμε λοιπόν αν η σημαντικά μειωμένη έκφραση του εκκρινόμενου (secreted, s) αναστολέα του Wnt, sFRP4, στα WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs (FC = -36.2), ευθύνεται, τουλάχιστον εν μέρει, για το μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα των πρώτων. Αρχικά εκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA του sFRP4 σε P2 WJ-MSCs (n = 5) στη διάρκεια της λιπογένεσης και πραγματικά διαπιστώθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασής του στην πορεία της διαφοροποίησης [***Εικόνα 22-i***]. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του sFRP4 mRNA την 14^{η} ημέρα της διαφοροποίησης ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ημέρα έναρξης (ημέρα μηδέν) και την 7^{η} ημέρα της διαφοροποίησης (P = 0.022 και P = 0.022, αντιστοίχως). Σε ένα επόμενο βήμα, P2 WJ-MSCs (n = 5) επωάστηκαν για 7 ημέρες παρουσία ή απουσία 20nM rh-sFRP4 σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει τη λιπογένεση και ακολούθως μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA δυο δεικτών ειδικών για τη λιπογένεση: του PPARG και του CEBPA. ΄Υστερα από επτά μέρες επώασης των WJ-MSCs με rh-sFRP4 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων, PPARG και CEBPA (P=0.012 και P=0.003, αντίστοιχα), σε σχέση με τα WJ-MSCs, που διαφοροποιήθηκαν απουσία της rh-sFRP4 ή σε σχέση με τα WJ-MSCs πριν την επαγωγή της διαφοροποίησης (P = 0.002 και P < 0.0001, αντίστοιχα) [***Εικόνα 22 – iii,iv***].

Το WISP1 ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα

Μελέτες έχουν δείξει πως το εκκρινόμενο μόριο WISP1 επάγει τη διαφοροποίηση των ανθρώπειων BM-MSCs προς οστεοβλάστες *in vitro* και πως η έκφραση του γονιδίου WISP1 αυξάνεται στη διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης των BM-MSCs προς οστεοκύτταρα. Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, παρατηρήσαμε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του WISP1 στα WJ-MSCs κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης τους προς οστεοκύτταρα [***Εικόνα 22 – ii]***. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του WISP1 mRNA την 14η ημέρα της διαφοροποίησης ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ημέρα έναρξης (ημέρα μηδέν) και την 7η ημέρα της διαφοροποίησης (P = 0.0095 και P = 0.0286, αντιστοίχως).Θέλοντας να διερευνήσουμε αν η μειωμένη έκφραση του γονιδίου WISP1 στα WJ-MSCs συγκριτικά με τα BM-MSCs, συμβάλλει με κάποιο τρόπο στο μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης των πρώτων προς οστεοκύτταρα, επωάσαμε P2 WJ-MSCs (n = 5) σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει την οστεογένεση, για 7 ημέρες, παρουσία ή απουσία 50ng/ml rh-WISP1, και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των δεικτών της οστεογένεσης RUNX2, ALP και OSC. Ύστερα από επτά μέρες επώασης των WJ-MSCs με rh- WISP1 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων RUNX2, ALP και OSC (P=0.026, P=0.0232 και P=0.0079, αντίστοιχα), σε σχέση με τα WJ-MSCs, που διαφοροποιήθηκαν απουσία της rh-WISP1 ή σε σχέση με τα WJ-MSCs πριν την επαγωγή της διαφοροποίησής τους οστεοκύτταρα (P = 0.0002, P = 0.0004 και P = 0.0043, αντίστοιχα) [***Εικόνα 22 – v-vii]***.


(i)
sFRP4
P = 0.022
P = 0.022
P = 0.0313
Σχετική έκφραση γονιδίων 2 -ΔCt
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0.0000
D0
D7
D14
(ii) WISP1
P = 0.0095
P = 0.0286
P = 0.0095
Σχετική έκφραση γονιδίων 2 -ΔCt
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
D0
D7
D14
(iii)
PPARG
P = 0.0002
P = 0.012
P = 0.0002
Σχετική έκφραση γονιδίων 2 -ΔCt
0.008
0.006
0.004
0.002
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
D0
D7
D7
No treatment
rh-sFRP4
(iv)
CEBPA
P < 0.0001
P = 0.003
P = 0.006
Σχετική έκφραση γονιδίων 2 -ΔCt
0020
0015
0010
0005
0000
D0
D7
D7
No treatment
rh-sFRP4



Εικόνα 22. *Επίδραση των sFRP4 και WISP1 στην διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα.*

Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή + 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων sFRP4 (i) και WISP1 (ii) στα WJ-MSCs σε διαφορετικά χρονικά σημεία στη διάρκεια της διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα αντιστοίχως. Τα ραβδογράμματα στα γραφήματα (iii-iv) αντιπροσωπεύουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή + 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων που σχετίζονται με την λιπογένεση (PPRAG και CEBPA), κατά τη διαφοροποίηση, παρουσία ή απουσία 20 nM ανθρώπινης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης sFRP4 (rh-sFRP4). Τα ραβδογράμματα στα γραφήματα (v-vii) αντιπροσωπεύουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή + 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων που σχετίζονται με την οστεογένεση (RUNX2, ALP και OSC), κατά τη διαφοροποίηση, παρουσία ή απουσία 50 ng/ml ανθρώπινης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης WISP1(rh-WISP1). Τα αποτελέσματα προέκυψαν με τη μέθοδο της real time PCR χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς. Οι συγκρίσεις των γονιδίων στα

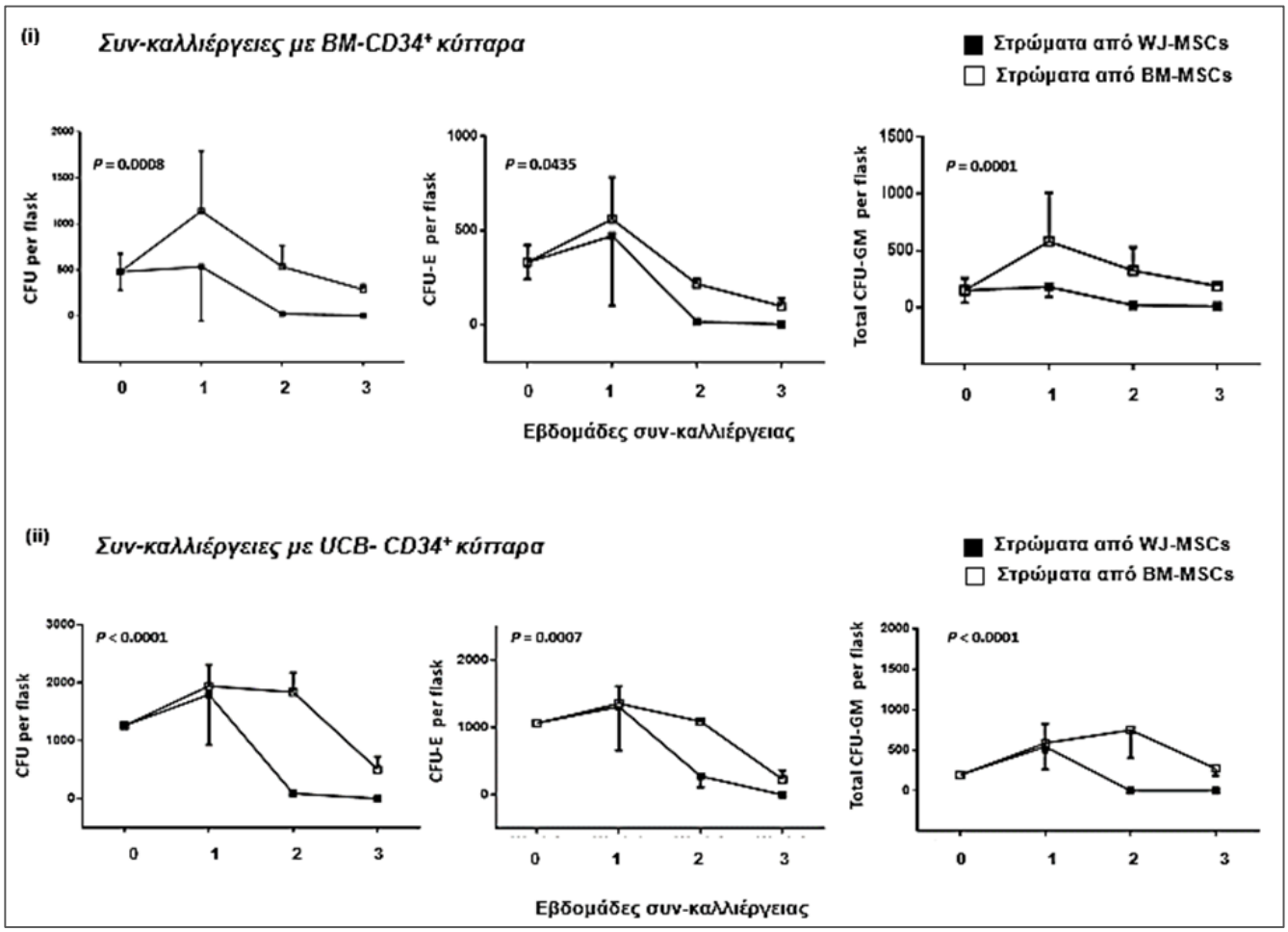
διαφορετικά χρονικά σημεία και ανάμεσα στις καλλιέργειες παρουσία ή απουσία των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann–Whitney U.

Τα WJ-MSCs διαθέτουν μειωμένη υποστηρικτική ικανότητα αιμοποίησης σε σχέση με τα BM-MSCs

Για να αξιολογηθεί η ικανότητα των WJ-MSCs και των BM-MSCs να υποστηρίζουν την ανάπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, μελετήσαμε την κλωνογονική ικανότητα των μη-προσκολλημένων κυττάρων (NACs) σε συν-καλλιέργειες ακτινοβολημένων P2 WJ-MSCs (n = 6) και BM-MSCs (n = 6). Ο αριθμός των συνολικών αποικιών (CFUs) στο κλάσμα των NACs ήταν σημαντικά μικρότερος στις συν-καλλιέργειες όπου το στρώμα προέρχονταν από WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs, ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης των CD34+ κυττάρων, για παράδειγμα, από το μυελό (P = 0.0008) [***Εικόνα 23-i]*** ή από ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠΑ) (P<0.0001) [***Εικόνα 23-ii***]. Ειδικότερα, ο αυξημένος αριθμός των CFU στις καλλιέργειες των BM-MSC σε σχέση με τον αντίστοιχο από τις καλλιέργειες των WJ-MSCs, οφειλόταν στον μεγαλύτερο αριθμό των CFU-E και των συνολικών CFU-GM προγονικών κυττάρων που προέρχονταν είτε από BM-CD34+ κύτταρα (P = 0.0435 και P = 0.0001, αντιστοίχως) [***Εικόνα 23-i***] ή από ΟΠΑ-CD34+ κύτταρα (P = 0.0007 και P < 0.0001, αντίστοιχα) [***Εικόνα 23-ii***]. Ωστόσο είναι ενδιαφέρον πως τα στρώματα και από τις δύο MSC πηγές, WJ-MSCs και BM-MSCs, εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα υποστήριξης της αιμοποίησης όταν αυτά ενοφθαλμίστηκαν με ΟΠΑ-CD34+ κύτταρα έναντι των BM-CD34+, όπως αποδείχτηκε και από τον αριθμό των ολικών CFU αποικιών (P < 0.0001 και P < 0.0001, αντιστοίχως).

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω ο υποστηρικτικός ρόλος των WJ- και BM-MSCs στην αιμοποίηση, μετρήθηκαν τα επίπεδα διαφόρων αιμοποιητικών κυτταροκινών FLT-3-ligand, SDF-1α, G-SCF και GM-CSF, σε υπερκείμενα P2, P6 και P10 καλλιεργειών από WJ-MSC (n=18) και BM-MSC (n=18). Όπως φαίνεται στον ***Πίνακα 4*** τα επίπεδα του FLT-3-ligand δεν διέφεραν ανάμεσα στα υπερκείμενα των WJ-MSCs και BM-MSCs στη διάρκεια της καλλιέργειας (P2-P6-P10), ενώ αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης του SDF-1α ανευρέθηκαν μειωμένα στα υπερκείμενα των WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs στη διάρκεια της καλλιέργειας (P = 0.0012). Επιπλέον τα επίπεδα των G-CSF και GM-CSF ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στα υπερκείμενα των WJ-MSC καλλιεργειών κατά τα P2-P6-P10 σχέση με τα αντίστοιχα των BM-MSC καλλιεργειών (P<0.0001 και P=0.0001, αντίστοιχα).

Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πως η μειωμένη ικανότητα των WJ-MSCs να υποστηρίζουν την αιμοποίηση συγκριτικά με τα BM-MSCs, είναι απίθανο να σχετίζεται με την μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών που επάγουν την αιμοποίηση, και πως ίσως σχετίζεται, εν μέρει, με την χαμηλή παραγωγή του παράγοντα SDF1-α.



Εικόνα 23. *Η ικανότητα των WJ-MSCs και BM-MSCs να στηρίζουν την αιμοποίηση. P2 WJ-MSCs και BM-MSCs καλλιεργούντο σε φλάσκες των 25cm^2 και όταν κάλυπταν την καλλιεργητική επιφάνεια σε ποσοστό 80-90%, ακτινοβολούνταν και συν-καλλιεργούντο με αλλογενή CD34+κύτταρα από το μυελό (BM-CD34+) (i) ή από ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCB-CD34+) (ii). Ανά εβδομάδα, και για διάστημα τριών εβδομάδων, ανανεωνόταν το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο κατά το ήμισυ και προσδιοριζόταν, για τα μη-προσκολλημένα στο πλαστικό αιμοποιητικά κύτταρα (non-adherent cells, NACs), η κλωνογονική ικανότητά τους, με βραχύχρονες μυελικές καλλιέργειες. Τα γραφήματα αναπαριστούν τον αριθμό (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση) των συνολικών κλωνογονικών αποικιών (CFUs), ερυθροκυτταρικές (CFU-E) και μεικτές CFU (CFU-GM), που ελήφθησαν από το κλάσμα των μη-προσκολλημένων κυττάρων, κατά την συν-καλλιέργεια των αλλογενών CD34+ κυττάρων με WJ-MSC ή BM-MSC «τάπητες».*

Η σύγκριση της μέσης τιμής των αποικιών που προέκυψαν στη διάρκεια της καλλιέργειας των τριών εβδομάδων, από τα WJ- και BM-MSC στρωματικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας.

Κυτταροκίνες (ng/mL)	Υπερκείμενα από καλλιέργειες WJ-MSC (v=18)			Υπερκείμενα από καλλιέργειες BM-MSC (v=18)			
	P2	P6	P10	P2	P6	P10	P value
FLT3L	13.79±0.75	14.35±1.24	13.74±0.87	13.77±0.96	14.70±62.33	13.43± 0.45	N.S.
SDF1-α	1189.00±380.40	1159.00±401.00	1032.00±269.00	2074±1247.00	1607.00±698.00	1369.00± 42.60	0.0012
G-CSF	108.30±100.70	578.00±409.80	388.00±360.00	N.D.	N.D.	N.D.	<0.0001
GM-CSF	12.19±9.46	145.20±135.60	37.70±13.58	N.D.	N.D.	N.D.	0.0002

Πίνακας 4. *Οι κυτταροκίνες μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, σε υπερκείμενα αντιπροσωπευτικών κυτταρικών περασμάτων (P2-P6-P10) από καλλιέργειες WJ-MSCs και BM-MSCs.*

Η σύγκριση των τιμών που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τη διπλή ανάλυση μεταβλητότητας αμφίδρομη ανάλυση διακύμανσης. Απεικονίζεται η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (P). N.D. (not detected) δεν ανιχνεύτηκαν. Τα δεδομένα εκφράζονται ως οι μέσες τιμές ± 1 τυπική απόκλιση.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την τελευταία δεκαετία, 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. Δεδομένου του κλινικού ενδιαφέροντος για τα εν λόγω κύτταρα κατέστη αναγκαία η διερεύνηση των ιδιαίτερων βιολογικών χαρακτηριστικών τους για την ορθή χρήση τους τόσο σε κυτταρικές θεραπείες όσο και στην ιστική μηχανική. Η χρήση των MSCs σε κλινικές εφαρμογές απαιτεί την *ex vivo* έκπτυξή τους ώστε να εξασφαλιστεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός κυττάρων. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η λεπτομερής συγκριτική μελέτη των WJ-MSCs με τα BM-MSCs. Τα τελευταία, αποτελούν τον πληθυσμό αναφοράς, καθώς συνιστούν τον εκτενέστερα μελετημένο MSC-πληθυσμό.

Τα MSCs και από τις δύο πηγές 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. Τα BM-MSCs και WJ-MSCs μελετήθηκαν συγκριτικά σε παράλληλα πειράματα, ως προς ποικίλες βιολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου και της Wnt-σηματοδότησης, τα οποία δεν είχαν μελετηθεί προηγουμένως. Επιπλέον μελετήθηκε για πρώτη φορά η εμπλοκή των μορίων της Wnt-σηματοδότησης στην ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs.

Τα δεδομένα της μελέτης απέδειξαν πως τα *ex vivo* καλλιεργούμενα WJ-MSCs εμφάνιζαν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα BM-MSCs, δηλαδή το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, όμοιο με αυτό των ινοβλαστών, καθώς και παρόμοια ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο τα WJ-MSCs αναπτύσσονταν ταχύτερα συγκριτικά με τα BM-MSCs, όπως προέκυψε από τα δεδομένα μελέτης παραμέτρων που σχετίζονται με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καλλιεργούμενων κυττάρων. Τα WJ-MSCs παρουσίαζαν μειωμένο χρόνο διπλασιασμού κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών P2-P10 και έντονη μεταβολική

ενεργότητα στο αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πέρασμα (P2), σε σχέση με τα μυελικά ομόλογά τους.

Παρά τα παραπάνω στοιχεία, η μελέτη των χαρακτηριστικών επιβίωσης έδειξε πως ο διαφορετικός ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ των δυο MSC πληθυσμών δεν οφείλεται σε διαφορές στην απόπτωση μεταξύ των MSC πληθυσμών, και ίσως θα μπορούσε να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στο αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των WJ-MSCs.

Πράγματι, σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό των WJ-MSCs εντοπίζονταν στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου συγκριτικά με τα BM-MSCs, όπως φάνηκε από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία για πρώτη φορά δείξαμε πως στα WJ-MSCs υπάρχει σημαντικά αυξημένη έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S και από τη G2 στην M, σε σχέση με τα BM-MSCs.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων CCND2, CDC25A, CCNA2, CCNB1, CDC28, CKS2, CDC25C, CDC20 και AURKB [***Εικόνα 19-ii],*** στα WJ-MSCs συγκριτικά με τα BM-MSCs, σε συνδυασμό με μείωση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου BCL2, το οποίο μεσολαβεί στην επιβράδυνση της μετάβαση στη φάση S, καθώς και του CDKN1B, που δεσμεύει τα κύτταρα στη φάση G1 του κύκλου.

Μέχρι την παρούσα μελέτη δεν υπήρχαν αναφορές συγκριτικής ανάλυσης των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs. Έτσι, τα αποτελέσματα μας δίνουν μια πρώτη εξήγηση ενισχύοντας την ιδέα του αυξημένου πολλαπλασιαστικού δυναμικού που χαρακτηρίζει τα WJ-MSCs σε σχέση με τα αντίστοιχα BM-MSCs.

Με δεδομένο ότι η κυτταρική γήρανση έχει συνδεθεί με την ελαττωματική ικανότητα πολλαπλασιασμού, μελετήσαμε περαιτέρω αν ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργούμενων BM-MSCs οφείλεται στην αυξημένη τάση τους προς πρώιμη κυτταρική γήρανση συγκριτικά με τα αντίστοιχα WJ-MSCs. Ωστόσο, η έκφραση τριών αναστολέων του κυτταρικού κύκλου που συνήθως υπερ-εκφράζονται στα «γηρασμένα» κύτταρα, δηλαδή των RB1, CDKN1A και CDKN2A, καθώς και η έκφραση του σχετιζόμενου με τη γήρανση γονιδίου PARG1, το οποίο αυξάνεται κατά την διάρκεια μιας καλλιέργειας (Kuilman et al., 2010; Schallmoser et al., 2010), δε φάνηκε να διαφέρει ανάμεσα στους δύο MSC πληθυσμούς κατά τα κυτταρικά περάσματα P2-P6-P10.

Αντιθέτως, το γονίδιο TP53 βρέθηκε να υπερ-εκφράζεται στα WJ-MSCs συγκριτικά με τα BM-MSCs. Ωστόσο το TP53 δε σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με την κυτταρική γήρανση αλλά λειτουργεί και ως «φύλακας» της ακεραιότητας του γονιδιώματος αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο και εξασφαλίζοντας στα κύτταρα τον απαιτούμενο χρόνο για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA (Zhao et al., 2010). Επομένως, εν όψει του αυξημένου δυναμικού πολλαπλασιασμού των WJ-MSCs υποθέτουμε, πως η υπερ-έκφραση του TP53 ίσως να λειτουργεί ως μια ασφαλιστική δικλείδα, προφυλάσσοντας τα κύτταρα από τη γενωμική αστάθεια κατά τη διάρκεια των διαδοχικών διαιρέσεων.
Το μήκος των τελομερών έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος δείκτης της κυτταρικής γήρανσης στα MSCs (Wagner et al., 2010; Bernadotte et al., 2016). Από τη μελέτη του παραπάνω δείκτη φάνηκε πως το μέσο μήκος των τελομερών δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των WJ-MSCs και των BM-MSCs στα κυτταρικά περάσματα P2-P6-P10, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την άποψη πως η κυτταρική γήρανση δεν ευθύνεται για το μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των τελευταίων.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, ο αριθμός των θετικών στη SA-β-gal κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένος στα BM-MSCs στη διάρκεια της καλλιέργειας, σε σχέση με τα WJ-MSCs. Αν και η ενεργότητα της SA-β-gal σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση, εντούτοις δεν είναι ένας απόλυτα ειδικός δείκτης του φαινομένου αυτού (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Matjusaitis et al., 2016). Αντιθέτως, μπορεί να δώσει ψευδώς-θετικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται ως η μοναδική μέθοδος μελέτης της κυτταρικής γήρανσης και για αυτό θα πρέπει πάντα τα αποτελέσματα της μεθόδου να ερμηνεύονται σε συνδυασμό και με άλλους βιο-δείκτες της γήρανσης (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Matjusaitis et al., 2016). Με δεδομένο ότι η έκφραση της ενεργότητας της SA-β-gal έχει συσχετιστεί κυρίως με τη μειωμένη πολλαπλασιαστική κατάσταση των κυττάρων (Matjusaitis et al., 2016), υποθέτουμε ότι το αυξημένο ποσοστό των θετικών κυττάρων για τη SA-β-gal ίσως να εξηγεί το μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των BM-MSCs συγκριτικά με τα WJ-MSCs.

Η χρήση και εφαρμογή των MSCs σε κυτταρικές θεραπείες μπορεί να απαιτεί μεγάλης έκτασης καλλιέργεια των κυττάρων. Για να διερευνηθεί αν η μακράς διάρκειας καλλιέργεια μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα των WJ-MSCs, μελετήσαμε τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά των WJ- και των BM-MSCs στη διάρκεια των κυτταρικών περασμάτων. Κλωνικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες εντοπίστηκαν σε δυο από τα δεκαοχτώ (11%) WJ-MSCs δείγματα που μελετήθηκαν, [del(1)(p34) και add(2)(p25.3)] και σε τρία από τα δεκαοχτώ (17%) BM-MSCs, (τρισωμία 5). Μάλιστα,

σε όλες τις περιπτώσεις με κυτταρογενετικές ανωμαλίες τα MSCs παρουσίασαν προοδευτική αναστολή του πολλαπλασιασμού και τελικά εισήλθαν σε κυτταρική γήρανση. Τα ευρήματα μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες προτείνεται πως ίσως τα BM-MSCs να παρουσιάζουν περιστασιακά γενετική αστάθεια ύστερα από μακράς διάρκειας καλλιέργεια, χωρίς όμως να υπάρχουν ευρήματα κακοήθους εξαλλαγής τους (Tarte et al., 2010 ; Capelli et al., 2014 ; Borgonovo et al., 2015). Σχετικά με τα WJ-MSCs, αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα που αναφέρονται μέχρι στιγμής στη γενωμική σταθερότητά τους (Nekanti et al., 2010; Capelli et al., 2011; Borghesi et al., 2013; Wang et al., 2013; Chen et al., 2014). Οι ανακολουθίες ανάμεσα σε αυτά τα αποτελέσματα πιθανώς να σχετίζονται με την ετερογένεια των MSCs πληθυσμών, τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται (κλασσική καρυοτυπική ανάλυση, φθορίζων in situ υβριδισμός – FISH ή συστοιχίες συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης – Comparative genomic hybridization,CGH, array). Συμπερασματικά, στηριζόμενοι στα ευρήματά μας, τα BM-MSCs και τα WJ-MSCs αναπτύσσουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες αν και σε παρόμοιο χαμηλό ποσοστό, όταν καλλιεργούνται, καθιστώντας λογική και αναγκαία την καρυοτυπική ανάλυση των *ex vivo* καλλιεργούμενων MSCs πριν από οποιαδήποτε κλινική εφαρμογή.

Σε σχέση με το *ex vivo* δυναμικό διαφοροποίησης, τα WJ-MSCs εμφάνισαν μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα συγκριτικά με τα BM-MSCs, όπως φάνηκε από την χρώση με Oil Red O, καθώς και από την έκφραση γονιδίων ειδικών για τη λιπογένεση (PPARG και CEBPA).

Αναφορικά με το δυναμικό διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα, αν και 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 WJ-MSCs και BM-MSCs, η ποσοτική έκφραση των σχετικών με την οστεογένεση γονιδίων (RUNX2, DLX5, ALP και OSC) ήταν σημαντικά μειωμένη στα WJ-MSCs.

Τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα (Karahuseyinoglu et al., 2007; Hsieh et al., 2010; Cavallo et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πως η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οστεογένεση και τη λιπογένεση ήταν επίσης μειωμένη και στα μη διαφοροποιημένα WJ-MSCs στο P2 συγκριτικά με τα BM-MSCs, υποδηλώνοντας την εξ αρχής μειωμένη γονιδιακή «τάση» των WJ-MSCs να διαφοροποιούνται προς την οστεοβλαστική και λιποκυτταρική σειρά.

Καθώς οι μηχανισμοί που ευθύνονται για το μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί και βασιζόμενοι στο γνωστό ρόλο του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού στην διαφοροποίηση των MSCs (Christodoulides et al., 2009; Pinzone et al., 2009; Laudes, 2011; Visweswaran et al., 2015), προχωρήσαμε στην συγκριτική μελέτη και διερεύνηση του προφίλ έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το παραπάνω μονοπάτι στα BM- και WJ-MSCs. Εικοσιπέντε από τα ογδόντα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν βρέθηκαν να διαφέρουν ως προς την έκφρασή τους ανάμεσα στους δύο MSC-πληθυσμούς. Αν και η λειτουργική σημασία αυτών των διαφορών μένει να αποσαφηνιστεί πλήρως, υποθέτουμε πως η διαφορετική έκφραση των σχετιζόμενων μορίων με το Wnt μονοπάτι σηματοδότησης έχει πιθανώς κάποιο ρόλο στο μειωμένο οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό των WJ-MSCs σε σύγκριση με τα BM-MSCs. Πράγματι, τα γονίδια WNT3A, -5A και -7B που προάγουν την οστεογένεση (Pinzone et al., 2009; Visweswaran et al., 2015), υπο-εκφράζονταν στα WJ-MSCs, ενώ η έκφραση του αρνητικού ρυθμιστή του κανονικού Wnt μονοπατιού, DKK1, γνωστού και ως αναστολέα της οστεογένεσης, ήταν αυξημένη. Επιπλέον, βασιζόμενοι στο εύρημα ότι η WNT-εκκρινόμενη πρωτεΐνη, WISP1, ήταν σημαντικά μειωμένη στα WJ-MSCs σε σχέση με τα BM-MSCs, σε συνδυασμό με υπάρχοντα δεδομένα που εμπλέκουν το μόριο στην *in vitro* οστεοβλαστική διαφοροποίηση και στην *in vivo* οστεογένεση (Inkson et al., 2008; Ono et al., 2011), εκτιμήθηκε η σημασία και η συμμετοχή του WISP1 στη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα. Η αυξανόμενη έκφραση του γονιδίου WISP1 στη διάρκεια της διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η προσθήκη rhWISP-1 στην καλλιέργεια αύξησε την ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοβλάστες όπως φάνηκε από την αυξημένη έκφραση των RUNX2, ALP και OSC, επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση πως η μειωμένη έκφραση του WISP1 στα WJ-MSCs σε σχέση τα αντίστοιχα BM-MSCs, πιθανά να εμπλέκεται στην μειωμένη ικανότητα των πρώτων να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα.

Είναι πλέον γνωστή από προηγούμενες μελέτες η εμπλοκή του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού στη διαφοροποίηση των MSCs προς λιποκύτταρα (Christodoulides et al., 2009; Laudes, 2011). Για το λόγο αυτό, και επειδή η έκφραση του γονιδίου sFRP4, μορίου γνωστού για τη συμμετοχή του στη λιπογένεση (Park et al., 2008; Visweswaran et al., 2015), βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στα WJ-MSCs συγκριτικά με τα BM-MSCs, προχωρήσαμε στη μελέτη του ρόλο του sFRP4 στη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα.

Η αύξηση της έκφρασης του sFRP4 mRNA κατά τη διαφοροποίηση των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η παρουσία της rh-sFRP4 στην καλλιέργεια αυξάνει την ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα όπως φάνηκε από την αυξημένη έκφραση των PPARG και CEBPA, ενισχύουν την υπόθεση ότι η μειωμένη έκφραση του sFRP4 στα WJ-MSCs σε σχέση τα αντίστοιχα BM-MSCs, πιθανά να εμπλέκεται στην μειωμένη ικανότητα των πρώτων να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα. Συμπερασματικά λοιπόν η συμμετοχή των WISP1 και sFRP4 στο δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs παρέχει νέα δεδομένα για τον ρόλο του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού στη βιολογία αυτού του MSC πληθυσμού

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τις βιολογικές ιδιότητες των WJ-MSCs, μελετήσαμε την ικανότητά τους να υποστηρίζουν την αιμοποίηση σε σύγκριση με τα BM-MSCs, καθώς τα μέχρι τώρα δεδομένα σε αυτό το πεδίο είναι περιορισμένα (Lu et al., 2006; Bakshi et al., 2008).

Για να ελέγξουμε την υποστηρικτική ικανότητα της αιμοποίησης των MSCs, πραγματοποιήσαμε πειράματα συν-καλλιεργειών. Συν-καλλιεργήθηκαν WJ-MSCs και BM-MSCs με τα ίδια CD34+ από ΟΠΑ ή από το μυελό υγιών δοτών, και έπειτα εκτιμήθηκε η κλωνογονική ικανότητα των CD34+ κυττάρων σε πειράματα συν-καλλιέργειας διάρκειας 3 εβδομάδων. Διαπιστώσαμε ότι η ικανότητα των CD34+ κυττάρων να σχηματίζουν μυελικές και ερυθροκυτταρικές αποικίες ήταν σημαντικά μειωμένη όταν αυτά συν-καλλιεργούντο με WJ-MSCs σε σύγκριση με BM-MSCs. Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύει μια προηγούμενη μελέτη (Bakshi et al., 2008), ενώ αντιφάσκει με μια άλλη στην οποία δεν εντοπίστηκαν διαφορές ως προς την υποστηρικτική ικανότητα της αιμοποίησης των MSCs από τον ομφάλιο λώρο και το μυελό (Lu et al., 2006). Το αντιφατικό αυτό αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στο γεγονός πως στην τελευταία μελέτη τα MSCs που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστηρικτικό στρώμα προέρχονταν από ολόκληρο τον ομφάλιο λώρο, με συνέπεια την ετερογένεια του MSC-πληθυσμού.

Δεν είναι γνωστό γιατί τα BM-MSCs υποστηρίζουν καλύτερα την αιμοποίηση σε σχέση με τα WJ-MSCs. Οι διαφορές στην υποστηρικτική ικανότητα αιμοποίησης μεταξύ των δυο μελετούμενων MSC πληθυσμών μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην διαφορετική παραγωγή κυτταροκινών.

Σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Friedman et al., 2007), δείξαμε πως τα WJ-MSCs εκκρίνουν σημαντικά μικρότερες ποσότητες του παράγοντα SDF-1α και μεγαλύτερες ποσότητες από τους παράγοντες G-CSF και GM-CSF, συγκριτικά με τα αντίστοιχα BM-MSCs. Υποθέτουμε, ωστόσο, ότι τα αυξημένα επίπεδα των G-CSF και

GM-CSF δεν επαρκούν να αντισταθμίσουν λειτουργικά τη μειωμένη παραγωγή του SDF-1α από τα WJ-MSCs (Olofsson 1991; Rosu-Myles et al., 2003). Επιπλέον η διαφορετική έκφραση των μορίων που εμπλέκονται στη WNT-σηματοδότηση ίσως έχει κάποιον ρόλο στην διαφορετική ικανότητα των δυο MSC πληθυσμών να υποστηρίζουν την αιμοποίηση. Για παράδειγμα, το κανονικό Wnt μονοπάτι, το οποίο ήταν αρνητικά ρυθμισμένο στα WJ-MSCs, φαίνεται πως έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (Cain et al., 2013), ενώ ο αναστολέας του κανονικού μονοπατιού,DKK1, που παρουσιάστηκε αυξημένος στα WJ-MSCs, έχει φανεί να επιδρά αρνητικά στη διαδικασία της αιμοποίησης (Fleming et al., 2008).

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα MSCs και από τις δύο πηγές εμφάνισαν μικρότερη αποτελεσματικότητα στο να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των CD34+ προερχόμενων από το μυελό συγκριτικά με τα CD34+ του ΟΠΑ. Αυτή η συμπεριφορά πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι στο κλάσμα των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού περιέχονται λιγότερα αρχέγονα και κλωνογονικά κύτταρα συγκριτικά με αυτά που εντοπίζονται στο ΟΠΑ (Hordyjewska et al., 2015).

Συνολικά, στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήσαμε μια αυστηρά συγκριτική μελέτη των *ex vivo* καλλιεργούμενων WJ-MSCs και BM-MSCs. Από την μελέτη αυτή προέκυψαν ενδιαφέροντα δεδομένα σχετικά με τα ανοσοφαινοτικά, κυτταρογενετικά και πολλαπλασιαστικά χαρακτηριστικά αυτών των κυτταρικών πληθυσμών, και δόθηκαν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την επιβίωση, το δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, καθώς και την ικανότητα των παραπάνω MSC πληθυσμών να υποστηρίζουν την αιμοποίηση.

Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν, για πρώτη φορά, ότι η διαφορετική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου και της WNT-σηματοδότησης, ίσως να ευθύνονται σημαντικά για τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δυο MSC πληθυσμών ως προς τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες. Επίσης αναδείξαμε τον εξέχοντα ρόλο των γονιδίων του WNT-σηματοδοτικού μονοπατιού, WISP1 και sFRP4 στο δυναμικό διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα, αντιστοίχως.

Αυτά τα δεδομένα συμβάλλουν στον καλύτερο χαρακτηρισμό των WJ-MSCs και των BM-MSCs εν όψει της χρήσης τους στην κλινική και ενθαρρύνουν την πιθανότητα τροποποίησης του Wnt-μονοπατιού, μέσω γενετικής μηχανικής, με στόχο να χρησιμοποιηθούν τα WJ-MSCs σε συγκεκριμένες κλινικές εφαρμογές. Τα τελευταία χρόνια η χρήση τρισδιάστατων πορώδων βιομιμητικών ικριωμάτων από φυσικά βιοϋλικά βρίσκονται στο επίκεντρο των κλινικών εφαρμογών. Η δημιουργία συμπλόκων μέσω συνδυασμού των ικριωμάτων με γενετικά τροποποιημένα MSCs, με

υψηλή οστεογενετική ικανότητα, θα εξασφαλίσουν ένα αξιόλογο ιατρικό εργαλείο για χρήση σε εφαρμογές οστεογένεσης.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. J R Soc Interface. 2010, Dec 6;7 (Suppl 6). S689-706.
2. Adewumi O, Aflatoonian B, et al., Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol. 2007 Jul;25(7):803-16.
3. Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. J Mol Endocrinol. 2012 Aug 30;49(2): R89-111.
4. Augello A, TB Kurth, and C De Bari. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. Eur Cell Mater, 2010. 20: p. 121-33.
5. Baksh D and Tuan RS. Canonical and noncanonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. 2007; J Cell Physiol 212:817–826.
6. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells 2007; 25: 1384-92.
7. Bakshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, et al. Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. Transfusion. 2008; 48:2638–44.
8. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. Hepatology. 2007 Jul;46(1):219-28.
9. Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, Siddiqui MM, Schuch G, Pohl HG, Fuhr J, Perin L, Soker S, Atala A. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. Stem Cells Dev. 2005 Jun;14(3):337-48.
10. Barzilay R, E Melamed, and D Offen. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making trans-differentiation possible. Stem Cells, 2009. 27(10): p. 2509-15.
11. Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. Curr Stem Cell Res Ther. 2013 Mar;8(2):144-55.

12. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells. 2004;22(5):675-82.
13. Bennett, C.N., et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. J. Biol.Chem. 2002. 277, 30998–31004.
14. Bentzinger CF, Wang YX, von Maltzahn J, Rudnicki MA. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. Bioessays, 2013. 35(3): p. 231-41.
15. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. Aging (Albany NY) 2016 Jan;8(1):3-11.
16. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. Exp Cell Res. 2003 Jul 1;287(1):98-105.
17. Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. “Mesenchymal” stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. Hum Gene Ther. 2010; 21:1057-1066.
18. 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.
19. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2004; Dec 15;93(6):1210-30.
20. Borghesi A, Avanzini MA, Novara F, Mantelli M, Lenta F, Achille V, et al. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. Cytotherapy. 2013; 15:1362–73.
21. Borgonovo T, Solarewicz MM, Vaz IM, Daga D, Rabelatto CL, Senegaglia AC, et al. Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation. Mol Cytogenet. 2015; 8:94.
22. Boudin, E., et al., The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. Semin Arthritis Rheum, 2013. 43(2): p. 220-240.
23. Boulais, P.E., and Frenette, P.S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. Blood. 2015;125, 2621-2629.
24. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell. 2005 Sep 23;122(6):947-56.
25. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Molecular Biology of the Cell, Garland Science; 2002; 4th edition.

26. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1998 Mar;16(2):155-62.
27. Cadigan, K.M. and Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev, 1997. 11(24): p. 3286-3305.
28. Cain CJ, Manilay JO. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies. Exp Hematol. 2013; 41:3–16.
29. Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. Cytotherapy. 2011; 13:786–801.
30. Capelli C, Pedrini O, Cassina G, Spinelli O, Salmoiraghi S, Golay J, et al. Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. Haematologica. 2014;99(6): e94–7.
31. Caplan AI, et al. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol. 2007; Nov 213(2):341-7.
32. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991; 9:641-650.
33. Cavallo C, Cuomo C, Fantini S, Ricci F, Tazzari PL, Lucarelli E, et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. J Cell Biochem. 2011; 112:1418–30.
34. Cawthorn, W.P., et al., Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. Bone, 2012. 50(2): p. 477-89.
35. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells. 2007 Nov;25(11):2739-49.
36. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. PloS One. 2014;9, e98565.
37. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2009; 37: 629-40.
38. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. Trends Endocrinol Metabol. 2009; 20:16–24.
39. Christodoulides, C., et al., Adipogenesis and WNT signalling. Trends Endocrinol Metab, 2009. 20(1): p. 16-24.

40. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 28;97(7):3213-8.
41. Coutinho, L. (1993). Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In Haemopoiesis: A practical Approach (Oxford: Oxford University Press), pp. 75-106.
42. Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G., and Beck, J.C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95, 10614-10619.
43. da Silva ML, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev. 2009; 20:419-427.
44. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. Arthritis Rheum. 2001 Jan;44(1a):85-95.
45. de Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R., van Blitterswijk, C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. 2004a. Bone 34, 818–826.
46. De Miguel MP, S Fuentes-Julian, and Y Alcaina. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. Stem Cell Rev, 2010. 6(4): p. 633-49.
47. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000, Aug;28(8):875-84.
48. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nat Protoc 2009;4(12):1798-806.
49. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: Hause H, Fussenegger M, eds. Methods in Molecular Medicine, 2nd Edition: Tissue engineering. Humana Press Inc., Totowa NJ; 2007. p. 67-82.
50. Delorme B, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. Blood. 2008; 111:2631-2635.
51. Deschaseaux F, Pontikoglou C, Sensebe L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. J Cell Mol Med. 2010; 14:103-115.
52. Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. Cell Transplant 2011; 20: 655-67.

53. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; Sep 26;92(20):9363-7.

54. Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8:315-317.

55. Fajardo-Orduña GR, Mayani H, Montesinos JJ. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. Arch Med Res. 2015 Nov;46(8):589-96.

56. Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M, De'Cillà M, Losi CG, Villa R, Lanfranchi A. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. Vet Res Commun. 2007 Aug;31 Suppl 1:1-8.

57. Fleming, HE, Janzen V, Lo CC, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. Cell Stem Cell. 2008; 2:274–83.

58. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. Hum Reprod. 1999; Mar;14(3):774-81.

59. Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev 2011; 7: 1-16.

60. Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod Biomed Online 2007; 15:708-18.

61. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. Br J Haematol. 2007 Jun;137(6):491-502.

62. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. Annu Rev Immunol. 2013; 31:285-316.

63. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. Biol Blood MarrowTransplant 2007; 13: 1477-86.

64. Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22(4):617-24.

65. Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M. Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. Exp Gerontol. 2003;38(8):887-95.
66. Gonsalves, F.C., et al., An RNAi-based chemical genetic screen identifies three smallmolecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011.108(15): p. 5954-5963.
67. Gregory, C.A., et al., How Wnt Signaling Affects Bone Repair by Mesenchymal Stem Cells from the Bone Marrow. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1049(1): p. 97-106.
68. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone. 1992;13(1):69-80.
69. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. Stem Cells. 2007 Jan;25(1):69-77.
70. Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. 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.
71. Hoffmann A, Floerkemeier T, Melzer C, Hass R. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. J Tissue Eng Regen Med. 2017 Sep;11(9):2565-2581.
72. Hoffmann, M.M., et al., Association of secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4) with type 2 diabetes in patients with stable coronary artery disease. Cardiovasc Diabetol, 2014. 13: p. 155.
73. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005 May 20;330(4):1153-61.
74. Hordyjewska A, Popiolek L, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. Cytotechnology. 2015; 67:387–96.
75. Hsieh JY, Fu YS, Chang SJ, Tsuang YH, Wang HW. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. Stem Cells Dev 2010; 19:1895-910.
76. Huang YC, Parolini O, La RG, Deng L. Umbilical cord versus bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Stem Cells Dev 2012; 21: 2900-3.
77. Inkson CA, Ono M, Kuznetsov SA, Fisher LW, Robey PG, Young MF. TGFbeta1 and WISP1/CCN-4 can regulate each other’s activity to cooperatively control osteoblast function. J Cell Biochem. 2008; 104:1865–78.

78. Jaishankar A, Barthelery M, Freeman WM, Salli U, Ritty TM, Vrana KE. Human embryonic and mesenchymal stem cells express different nuclear proteomes. Stem Cells Dev. 2009 Jun;18(5):793-802.
79. Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. Neuroreport. 2004 Aug 6;15(11):1731-4.
80. Jones, S.E. and Jomary, C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. Bioessays, 2002. 24(9): p. 811-20.
81. Kahler, R.A., Westendorf, J.J. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. J. Biol. Chem. 2003. 278, 11937–11944.
82. Kahler, R.A., Yingst, S.M., Hoeppner, L.H., Jensen, E.D., Krawczak, D., Oxford, J.T., Westendorf, J.J. Collagen 11a1 is indirectly activated by lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) and negatively regulates osteoblast maturation. Matrix. Biol. 2008.27, 330–338.
83. Kang, S., et al., Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferatoractivated receptor gamma. J Biol Chem, 2007. 282(19): p. 14515-24.
84. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells 2007; 25: 319-31.
85. Karen Bieback and Irena Brinkmann.Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. World J Stem Cells. 2010 Aug 26; 2(4): 81–92.
86. Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, Vlahava VM, Delorme B, Eliopoulos GD, Jorgensen C, Charbord P, Häupl T, Boumpas DT, Papadaki HA. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases 2008; 67: 741-749.
87. Kawano, Y. and Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci, 2003. 116(13): p. 2627-2634.
88. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther. 2007;9(1):204.
89. Komiya, Y. and R. Habas. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis, 2008. 4(2):p. 68-75.
90. Kozhevnikova MN, Mikaelian AS, Paiushina OV, Starostin VI. 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.

91. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. Genes Dev 2010 Nov 15;24(22):2463-79.
92. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct- 4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. Histochem Cell Biol 2009; 131: 267-82.
93. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. J Mol Endocrinol. 2011; 46:65- 72.
94. Le Blanc K, Ringdén O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. Curr Opin Immunol. 2006 Oct;18(5):586-91.
95. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. Genes Dev 2014 Jul 15;28(14):1517-32.
96. Lin H. The tao of stem cells in the germline. Annu Rev Genet. 1997; 31:455-91.
97. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. Gene. 2009 Mar 15;433(1-2):1-7.
98. Liu J, Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. J Biol Chem. 2004; 22;279(43):45020-7.
99. Liu, G., et al., Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. J Cell Biol, 2009. 185(1): p. 67-75.
100. Lo Iacono M, Anzalone R, La Rocca G, Baiamonte E, Maggio A, Acuto S. Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells as a Feeder Layer for the Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Review. Stem Cell Rev. 2017 Feb;13(1):35-49.
101. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica. 2006; 91:1017–26.
102. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. Stem Cell Rev 2011; 7: 17-31.
103. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. 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.
104. Masoud Maleki, Farideh Ghanbarvand, Mohammad Reza Behvarz, Mehri Ejtemaei, and Elham Ghadirkhomi. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. Int J Stem Cells. 2014 Nov; 7(2): 118–126.

105. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. Ageing Res Rev 2016 Aug; 29:1-12.

106. Mishima, S., Nagai, A., & Abdullah, S. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. European Journal of Haematology, 2010; 84(6), 538–546.

107. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. Am J Pathol 2009; 175: 303-13.

108. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. Cell Immunol 2010; 264: 171-9.

109. Nakamura-Ishizu, A., Okuno, Y., Omatsu, Y., Okabe, K., Morimoto, J., Uede, T., Nagasawa, T., Suda, T., and Kubota, Y. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. Blood. 2012;119, 5429-5437.

110. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. Placenta 1997; 18: 53-64.

111. Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, Jan M, Totey S, Ta M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2010; 19: 117-30.

112. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. Nat Med. 2014 Aug;20(8):870-80.

113. Olofsson TB. Growth regulation of hematopoietic cells. An overview. Acta Oncol. 1991; 30:889–902.

114. Ono M, Inkson CA, Kilts TM, Young MF. WISP1/CCN4 regulates osteogenesis by enhancing BMP-2 activity. J Bone Miner Res. 2011; 26:193–208.

115. Papadaki, H.A., Eliopoulos, A.G., Kosteas, T., Gemetzi, C., Damianaki, A., Koutala, H., Bux, J., and Eliopoulos, G.D. (2003). Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. Blood 101, 2591-2600.

116. Park JR, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Cell Prolif. 2008; 41:859–74.

117. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, Kontakis M, Galanopoulos A, Kotsianidis I, Kastrinaki MC, Papadaki HA. Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with

myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway. Stem Cells Dev. 2014. Jul 15;23(14):1568-81.

118. Pavlaki KI, Kastrinaki MC, Klontzas M, Velegraki M, Mavroudi I, Papadaki HA, Abnormal telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells and granulocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia. Haematologica, 2012. 97, 743-750.

119. Perdikogianni C, Dimitriou H, Stiakaki E, Martimianaki G, Kalmanti M. Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? Cytotherapy 2008; 10: 452-9.

120. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. Blood 1996; 87:2244-2251.

121. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. Blood. 2009; 113:517–25.

122. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science.1999;284:143-147.

123. Poloni A, Maurizi G, Babini L, Serrani F, Berardinelli E, Mancini S, Costantini B, Discepoli G, Leoni P. Human mesenchymal stem cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion. Cell Transplant. 2011;20(5):643-54.

124. Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. Regen Med. 2008; 3:731-741.

125. Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cell Rev. 2011; 7:569-589.

126. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

127. Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, Mandrup S, Abdallah BM, Kassem M. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res. 2007 Nov;22(11):1720-31.

128. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev. 2001 May 31;122(7):713-34.

129. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. FASEB J 2006; 20:1045-1054.

130. Rosu-Myles M, Bhatia M. SDF-1 enhances the expansion and maintenance of highly purified human hematopoietic progenitors. Hematol J. 2003; 4:137–45.

131. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell 2007; 131:324e336.
132. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In vitro Cell Dev Biol Anim 2012; 48: 75-83.
133. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. Haematologica 2010 Jun;95(6):867-74.
134. Schipani E, Kronenberg HM, et al. Adult mesenchymal stem cells. Stem book [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008-2009 Jan 31.
135. Seo, E., et al., SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. Cell Rep, 2013. 3(6): p. 2075-87.
136. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2006; Sep 50(3): 205-16.
137. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res.2003; 18:696-704.
138. Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. Transplantation. 2009;87(Suppl 9): S45-S49.
139. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Physiol. 2005 May;203(2):398-409.
140. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Feb;24(2):462-71.
141. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone. 2003 Dec;33(6):919-26.
142. Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X.B., Suda, T., et al. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. 2012; Cell 150, 351-365.
143. Takahashi K and S Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.
144. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood. 2010; 115:1549–53.

145. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

146. Tormin A, Brune JC, Olsson E, Valcich J, Neuman U, Olofsson T, Jacobsen SE, Scheding S. 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.

147. Troyer DL, Weiss ML. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells 2008; 26:591-9.

148. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther. 2003;5(1):32-45.

149. Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De LM, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. Best Pract Res Clin Haematol 2010; 23:245-57.

150. Verfaillie C. Pluripotent stem cells. Transfus Clin Biol. 2009 May;16(2):65-9.

151. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends Cell Biol. 2002 Nov;12(11):502-8.

152. Vilchez D, Simic MS, Dillin A. Proteostasis and aging of stem cells. Trends Cell Biol. 2014 Mar;24(3):161-70.

153. Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, Alberca M, Pérez-Simon JA, San Miguel JF, Del Cañizo MC. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. 2004 Dec;89(12):1421-7.

154. Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, Newsholme P, Dilley R, Pervaiz S, Dharmarajan A. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells - To Wnt, or not Wnt. Int J Biochem Cell Biol. 2015 Nov; 68:139-47.

155. Visweswaran, M., et al., Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 4 upregulates adipogenic differentiation in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. PLoS One, 2015. 10(2): p. e0118005.

156. Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Joussen S, Ma N, Strunk D, et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? Aging (Albany NY) 2010 Apr;2(4):224-30.

157. Wagner, W., Roderburg, C., Wein, F., et al. Molecular and secretary profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. Stem Cells, 2007; 25, 2638–2647.

158. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004; 22:1330-7.

159. Wang XY, Lan Y, He WY, et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. Blood 2008; 111: 2436-43.

160. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death Dis. 2013;4, e950.

161. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell, 2012. 10(4): p. 440-54.

162. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells 2006; 24: 781-92.

163. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized blood adult blood are not. Br J Haematol 2003; 121: 368-74.

164. Wodarz, A. and Nusse, R. Mechanisms of wnt signaling in development. Ann Rev Cell Dev Biol, 1998. 14(1): p. 59-88.

165. Wray J, Kalkan T, Smith AG. The ground state of pluripotency. Biochem Soc Trans. 2010 Aug;38(4):1027-32.

166. Yamada, A., et al., Diverse functions of secreted frizzled-related proteins in the osteoblastogenesis of human multipotent mesenchymal stromal cells. Biomaterials, 2013. 34(13): p. 3270-3278.

167. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. Regen Med. 2009 Mar;4(2):265-73.

168. Yu KR, Kang KS. Aging-related genes in mesenchymal stem cells: a mini-review. Gerontology. 2013;59(6):557-63.

169. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. 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.

170. Zhao T, Xu Y. p53 and stem cells: new developments and new concerns. Trends Cell Biol 2010 Mar;20(3):170-5.

171. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. Stem Cells 2006; 24:928-935.

9. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Batsali et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:102
DOI 10.1186/s13287-017-0555-9

Stem Cell Research & Therapy

RESEARCH Open Access

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

Aristea K. Batsali[1,2], Charalampos Pontikoglou[1], Dimitrios Koutroulakis[3], Konstantia I. Pavlaki[1], Athina Damianaki[1], Irene Mavroudi[1], Kalliopi Alpantaki[4], Elisavet Kouvidi[1], George Kontakis[4] and Helen A. Papadaki[1*]

Abstract

Background: In view of the current interest in exploring the clinical use of mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources, we performed a side-by-side comparison of the biological properties of MSCs isolated from the Wharton's jelly (WJ), the most abundant MSC source in umbilical cord, with bone marrow (BM)-MSCs, the most extensively studied MSC population.

Methods: MSCs were isolated and expanded from BM aspirates of hematologically healthy donors (n = 18) and from the WJ of full-term neonates (n = 18). We evaluated, in parallel experiments, the MSC immunophenotypic, survival and senescence characteristics as well as their proliferative potential and cell cycle distribution. We also assessed the expression of genes associated with the WNT- and cell cycle-signaling pathway and we performed karyotypic analysis through passages to evaluate the MSC genomic stability. The hematopoiesis-supporting capacity of MSCs from both sources was investigated by evaluating the clonogenic cells in the non-adherent fraction of MSC co-cultures with BM or umbilical cord blood-derived $CD34^+$ cells and by measuring the hematopoietic cytokines levels in MSC culture supernatants. Finally, we evaluated the ability of MSCs to differentiate into adipocytes and osteocytes and the effect of the WNT-associated molecules WISP-1 and sFRP4 on the differentiation potential of WJ-MSCs.
(Continued on next page)

Batsali et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:102
DOI 10.1186/s13287-017-0555-9

Stem Cell Research & Therapy

RESEARCH Open Access

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

Aristea K. Batsali[1,2], Charalampos Pontikoglou[1], Dimitrios Koutroulakis[3], Konstantia I. Pavlaki[1], Athina Damianaki[1], Irene Mavroudi[1], Kalliopi Alpantaki[4], Elisavet Kouvidi[1], George Kontakis[4] and Helen A. Papadaki[1*]

Abstract

Background: In view of the current interest in exploring the clinical use of mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources, we performed a side-by-side comparison of the biological properties of MSCs isolated from the Wharton's jelly (WJ), the most abundant MSC source in umbilical cord, with bone marrow (BM)-MSCs, the most extensively studied MSC population.

Methods: MSCs were isolated and expanded from BM aspirates of hematologically healthy donors (n = 18) and from the WJ of full-term neonates (n = 18). We evaluated, in parallel experiments, the MSC immunophenotypic, survival and senescence characteristics as well as their proliferative potential and cell cycle distribution. We also assessed the expression of genes associated with the WNT- and cell cycle-signaling pathway and we performed karyotypic analysis through passages to evaluate the MSC genomic stability. The hematopoiesis-supporting capacity of MSCs from both sources was investigated by evaluating the clonogenic cells in the non-adherent fraction of MSC co-cultures with BM or umbilical cord blood-derived $CD34^+$ cells and by measuring the hematopoietic cytokines levels in MSC culture supernatants. Finally, we evaluated the ability of MSCs to differentiate into adipocytes and osteocytes and the effect of the WNT-associated molecules WISP-1 and sFRP4 on the differentiation potential of WJ-MSCs.
(Continued on next page)

* Correspondence: e.papadaki@uoc.gr
[1]University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Results: Both ex vivo-expanded MSC populations showed similar morphologic, immunophenotypic, survival and senescence characteristics and acquired genomic alterations at low frequency during passages. WJ-MSCs exhibited higher proliferative potential, possibly due to upregulation of genes that stimulate cell proliferation along with downregulation of genes related to cell cycle inhibition. WJ-MSCs displayed inferior lineage priming and differentiation capacity toward osteocytes and adipocytes, compared to BM-MSCs. This finding was associated with differential expression of molecules related to WNT signaling, including *WISP1* and *sFRP4*, the respective role of which in the differentiation potential of WJ-MSCs was specifically investigated. Interestingly, treatment of WJ-MSCs with recombinant human WISP1 or sFRP4 resulted in induction of osteogenesis and adipogenesis, respectively. WJ-MSCs exhibited inferior hematopoiesis-supporting potential probably due to reduced production of stromal cell-Derived Factor-1α, compared to BM-MSCs.

Conclusions: Overall, these data are anticipated to contribute to the better characterization of WJ-MSCs and BM-MSCs for potential clinical applications.

Keywords: Bone marrow, Wharton's jelly, Mesenchymal stem cells, Cell cycle, WNT pathway

Background

In the past 16 years, the field of mesenchymal stem (stromal) cells (MSCs) has progressed at a great pace, as their exceptional characteristics are being unraveled and encouraging data from preclinical and clinical studies accumulate. In this regard, MSC-based treatment is now considered as a promising modality in the therapeutic intervention of various diseases or tissue damage [1].

Bone marrow (BM)-derived MSCs have been considered as the gold standard for clinical applications. However, there is currently great interest in identifying alternative, more easily accessible sources of MSCs. In this context, umbilical cord (UC), a medical waste obtained with a painless, simple and safe procedure during delivery, has drawn much attention as an attractive substitute of the BM for MSC isolation [2].

MSC origin may have an important impact in the biological properties of the cells and may even affect their effectiveness in cell-based therapies [3]. As regards to differences between BM- and UC-derived MSCs, contradictory results have been published so far, probably due to discrepancies in the isolation protocols of UC-MSCs in different studies [4]. Interestingly, MSCs from different UC compartments have been reported to possess different biological properties [5].

In view of the current interest in exploring the use of UC-MSCs from different sources in the clinic, the proper characterization of the cells is of particular importance. In the present study, we have performed a side-by-side comparison of MSCs isolated from the Wharton's jelly (WJ), the most abundant source of MSCs in UC [4], with BM-MSCs, the most extensively studied adult MSC population [3]. Specifically, we have comparatively studied the biological properties of the WJ-MSCs and BM-MSCs, namely their proliferative potential, the survival and senescence characteristics, the differentiation potential toward osteocytes and adipocytes and their capacity to support hematopoiesis. We have also explored the cell cycle distribution of the two MSC populations, in association with the expression of cell cycle-related genes. Because the WNT pathway has been involved in the proliferation and differentiation process of MSCs from different sources, we have probed the expression of genes related to the WNT signaling and the effect of WNT-related molecules in the differentiation capacity of WJ-MSCs. The results of the study have pointed out significant differences in the biological properties of BM- and WJ-derived MSCs that should be taken into consideration when choosing the best MSC source for a given application.

Methods

Samples

UC samples were obtained from 18 full-term neonates (38 to 39 weeks) following normal labor. BM samples were obtained from 18 hematologically healthy individuals (nine males and nine females, median age 50 years) undergoing orthopedic surgery for hip replacement. The study has been approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion and informed consent for the UC and the BM donation was obtained from the neonate mothers and the individuals undergoing surgery, respectively, according to the Helsinki Protocol.

MSC cultures

MSCs were isolated from BM and WJ as previously described and expanded in appropriately supplemented alpha-Minimum Essential Medium (α-MEM; Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland), at 37 °C/5% CO_2 fully humidified atmosphere [6–8]. The culture medium was replaced twice per week and on 80–90% confluency, MSCs were detached using 0.25% Trypsin–1mM EDTA (Gibco, Invitrogen), reseeded at a concentration of 2000 cells/cm^2 and further expanded for a total of ten passages (P) [6, 7].

Cell-free supernatants from WJ- and BM-MSC cultures at P2, P6 and P10 were stored at -80 °C for quantification of FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L; Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Granulocyte- Colony Stimulating Factor (high sensitivity human G-CSF; Quantikine, R&D Systems), Stromal Cell-derived Factor-1α (human CXCL12/SDF-1α; Quantikine, R&D Systems) and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (human GM-CSF; Affymetrix, eBioscience, San Diego, CA, USA), by means of enzyme-linked immunosorbent assay.

Immunophenotype and survival characteristics of MSCs

Trypsinized MSCs from P2 to P10 were immunophenotypically characterized by flow cytometry using anti-human monoclonal antibodies (mAb) against CD29 (4B4; Cyto-Stat/Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), CD44 (J173; Immunotech/Beckman Coulter, Marseille, France), CD73 (AD2; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD90 (F15.42; Immunotech/ Beckman Coulter), CD105 (SN6; Caltag, Burlingame, CA, USA), anti-CD146 (P1H12; BD Biosciences Pharmingen), CD45 (IMMU19.2; Immunotech/ Beckman Coulter), CD14 (RMO52; Immunotech/ Beckman Coulter), CD34 (QBend10; Beckman Coulter), CD31 (5.6E; Immunotech/Beckman Coulter), CD19 (J3-119; Immunotech/Beckman Coulter) and HLA-DR (Immu-357, Immunotech/Beckman Coulter), as previously described [6].

Flow cytometry was also used to study the apoptotic characteristics of MSCs at two representative passages (P2 and P6) by means of 7-aminoactinomycin D staining (7-AAD; Calbiochem-Novabiochem, Nottingham, UK) as previously described [9]. Results were expressed as proportions of 7-AAD^{neg} (live), 7-AAD^{dim} (early apoptotic) and 7-AAD^{bright} (late apoptotic) cells. Acquisition and analysis were performed in a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) on a minimum of 10,000 events.

Cell cycle analysis of MSCs

For cell cycle analysis, BM- and WJ-MSCs from P2, at a confluency of 80–90% were trypsinized, washed with PBS and fixed with 70% cold ethanol. Cells were treated with 0.5 mg/mL RNase A (PureLink RNase A; Invitrogen) and stained with 50 μg/mL propidium iodide (PI, Invitrogen) in the dark for 30 min at 37 °C. DNA content was determined by flow cytometry and the percentage of cells in different phases of cell cycle was assessed. A minimum of 100,000 events were acquired per sample.

Proliferative potential of MSCs

The proliferative potential of MSCs was evaluated by a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT)-based assay at P2 and by estimating the population doubling (PD) time through P2-P10 [6, 7, 10]. The formula $2^n = Nx/No$ was used to calculate the PDs of cells at each passage based on the number of cells counted in the flask after trypsinization (Nx) and the number of cells initially plated (No) [6, 7, 10]. Cumulative PDs were also calculated as previously described [11].

Assessment of MSC senescence

Evaluation of senescence-associated gene expression

A real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the evaluation of the expression of genes associated with cell senescence, namely the senescence-associated cyclin-dependent kinase (CDKN) inhibitors *CDKN1A* (*p21*), *CDKN2A* (*p16*) and *CDKN2B* (*p15*), the tumor suppressors *TP53* and retinoblastoma (*RB1*), and the phosphate-associated RhoGAP protein-tyrosine (*PARG1*) in P2, P6, and P10 MSCs, as previously described [6, 7, 10]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as internal control gene and gene expression values were expressed as $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct^{\text{gene of interest}} - Ct^{\text{GAPDH}}$.

MSC relative telomere length measurement

DNA was extracted from P2, P6, and P10 MSCs using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the relative telomere length was evaluated using a previously described semi-quantitative real-time PCR method with β-globin as control single-copy gene [12]. The relative telomere length was expressed as $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct^{\text{telomere}} - Ct^{\beta\text{-globin}}$).

Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) expression

Expression of SA-β-gal at P2, P6 and P10 MSCs was determined by a chromogenic assay as previously described [7, 13]. The number of SA-β-gal-positive MSCs was evaluated under a phase-contrast microscope per 100 consecutively counted MSCs. All experiments were performed in triplicate.

MSC differentiation assays

Trypsinized WJ- and BM-MSCs from P2 were induced to differentiate into adipocytes and osteocytes as previously described [6, 10, 14]. Adipogenesis was assessed by Oil Red O and osteogenesis by Alizarin Red and Von Kossa staining [6, 14]. Furthermore, total RNA from BM- and WJ-MSCs following differentiation at P2 toward adipocytes and osteocytes was isolated, reverse transcribed and subsequently amplified by real-time RT-PCR, for the quantification of genes related to adipogenesis, namely peroxisome proliferator activated receptor-γ (*PPARG*) and CCAAT/enhancer-binding protein alpha (*CEBPA*), and osteogenesis, namely alkaline phosphate (*ALP*), osteocalcin (*OSC*), distal-less homeobox protein 5 (*DLX5*) and runt-related transcription

factor 2 (RUNX2). *GAPDH* was used as internal control gene. The primer sequences and real-time RT-PCR detailed conditions have been described previously [12].

In a set of experiments, adipogenesis- or osteogenesis-related gene expression in WJ-MSCs was evaluated by real-time RT-PCR following differentiation of P2 cells in the presence or absence of 20 nM recombinant human (rh)-secreted frizzled related protein 4 (rh-sFRP4, R&D Systems) or 50 ng/ml rh-WNT1-inducible-signaling pathway protein 1 (rh-WISP1, R&D Systems), respectively.

Cytogenetic analysis of MSCs

Conventional cytogenetic analysis of BM- and WJ-MSCs was performed at P2, P6 and P8 as previously described [15–17]. MSC metaphases were identified using trypsin-Giemsa (GTG) banding and 15 to 25 metaphase cells were analyzed and classified according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [16]. A chromosomal aberration was defined as clonal abnormality when at least two metaphases were demonstrating the same structural rearrangement or chromosome gain, whereas a chromosome loss had to be identified in at least three metaphases [15, 16].

WNT signaling pathway and cell cycle PCR arrays

Total RNA was isolated from BM-MSC ($n = 6$) and WJ-MSC ($n = 6$) cultures at P2 as previously described [12]. By using the human WNT Signaling Pathway RT^2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences, Qiagen) we profiled the expression of 84 genes related to WNT-mediated signal transduction. Similarly, using the human Cell Cycle RT^2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences, Qiagen) we profiled the expression of 84 genes related to cell cycle signaling pathway. The fold change (FC) for each gene between the group of WJ-MSCs and the group of BM-MSCs was calculated with the ΔΔCt method ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). At least a two-fold difference in gene expression between WJ- and BM-MSCs was considered significant [12].

Validation of the WNT PCR array results by real-time RT-PCR

To validate the PCR - array results, significantly down- and over-expressed genes were further assessed in BM- and WJ-MSCs (P2) by real-time RT-PCR (SYBR GreenER qPCR Supermix; Invitrogen), using the specific primers of the PCR array for *WISP1*, *sFRP4* and *GAPDH* (SABiosiences, Qiagen). Reactions were performed in Rotor-Gene 6000 using a two-step cycling program consisting of 45 cycles of 95 °C for 3 seconds and 60 °C for 30 seconds. A melting curve (62–95 °C) was generated at the end of each run to verify specificity of the reactions.

Evaluation of the hematopoiesis-supporting capacity of MSCs

A previously described two-stage culture procedure was used to test the capacity of WJ- and BM-MSCs to support normal hematopoiesis [12]. In brief, confluent MSC stromal layers from WJ and BM samples, grown in 25cm^2 flasks, were irradiated (10 Gy), recharged with immunomagnetically sorted (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) normal allogeneic BM- or UC blood (UCB)-derived CD34$^+$ cells (5×10^4) and kept in 10 mL appropriately supplemented Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) at 37 °C/5% CO_2 fully humidified atmosphere. At weekly intervals for a total of 3 weeks, cultures were fed by demi-depopulation and the non-adherent cells (NACs) were counted and assayed for clonogenic progenitor cells, namely granulocyte colony-forming units (CFU-G), macrophage CFU (CFU-M), granulocyte-macrophage CFU (CFU-GM), and erythroid - CFU (CFU-E), as previously described [12, 18, 19]. The colonies were finally defined as total myeloid, that is, total CFU-GM (CFU-G plus CFU-M plus CFU-GM), CFU-E, and total CFU (total CFU-GM plus CFU-E) [12, 18, 19].

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism Statistical PC program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Grouped data were expressed as mean ± 1 standard deviation and compared by means of the non-parametric Mann–Whitney *U* test. The two-way analysis of variance was used to define differences between WJ-MSCs and BM-MSCs in PD time, gene expression and cytokine levels through passages as well as in CFU numbers in culture supernatants time course and in optical density obtained by MTT at P2. The chi-square test was used for the evaluation of differences between WJ-MSCs and BM-MSCs in the frequency of cytogenetic aberrations through passages.

Results

BM- and WJ-MSCs exhibit similar morphologic and immunophenotypic characteristics

BM- and WJ-derived MSCs were successfully expanded and serially reseeded for ten passages. Cultured MSCs from both sources displayed the characteristic spindle-like morphology and the immunophenotypic analysis throughout P2-P10 demonstrated that cultures constituted of a homogenous cell population positive for CD73, CD90, CD146, CD105, CD29, CD44 and negative for CD31, CD19, CD45, CD14, CD34 and HLA-DR surface antigens. No difference was identified between BM- and WJ-MSCs in the expression of any of the above markers.

BM-MSCs grow at a slower rate compared to WJ-MSCs

The PD time in BM-MSC cultures was significantly increased in comparison to WJ-MSCs throughout P2-P10. Specifically, as shown in Fig. 1a, the PD time ranged from 3.88 ± 1 days (P2) to 10.9 ± 1.7 days (P10) in BM-MSCs versus 1.88 ± 1.18 days (P2) to 4 ± 1.6 days (P10) in WJ-MSCs ($P < 0.0001$). In accordance with these findings are the results obtained by the MTT assay at a representative passage (P2), which showed that the number of metabolically active BM-MSCs, corresponding to the obtained optical density, remained significantly lower during the 21-day culture period, compared to WJ-MSCs ($P < 0.0001$) (Fig. 1b). Finally, the individual long-term growth curve data depicted in Fig. 1c, clearly show the inferior proliferative potential of BM-MSCs compared to WJ-MSCs. Taken together, these findings suggest that BM-MSCs grow at a significant slower rate compared to WJ-MSCs.

BM- and WJ-MSCs display similar survival characteristics through passages

To investigate whether the difference in the growth rate between BM- and WJ-MSCs is associated with altered survival characteristics, we evaluated the proportion of apoptotic cells at P2 and P6 by means of 7-AAD expression. No statistically significant differences were identified, however, in the proportion of apoptotic cells (expressed as the sum of 7-AAD^{dim} and 7-AAD^{bright} cells) between BM- and WJ-MSCs at either P2 (8.42 ± 2.6% and 7.9 ± 1.92%, respectively) or P6 (7.7 ± 4.66% and 6 ± 3.25%, respectively).

Since replicative cell senescence has been associated with defective proliferative capacity, we investigated whether culture-expanded BM-MSCs are more prone to cellular senescence compared to WJ-MSCs. To this end, we evaluated SA-β-gal activity, telomere length and senescence-associated gene expression through passages, as indices of cell senescence. The number of SA-β-gal-positive cells at P2, P6 and P10 was significantly higher

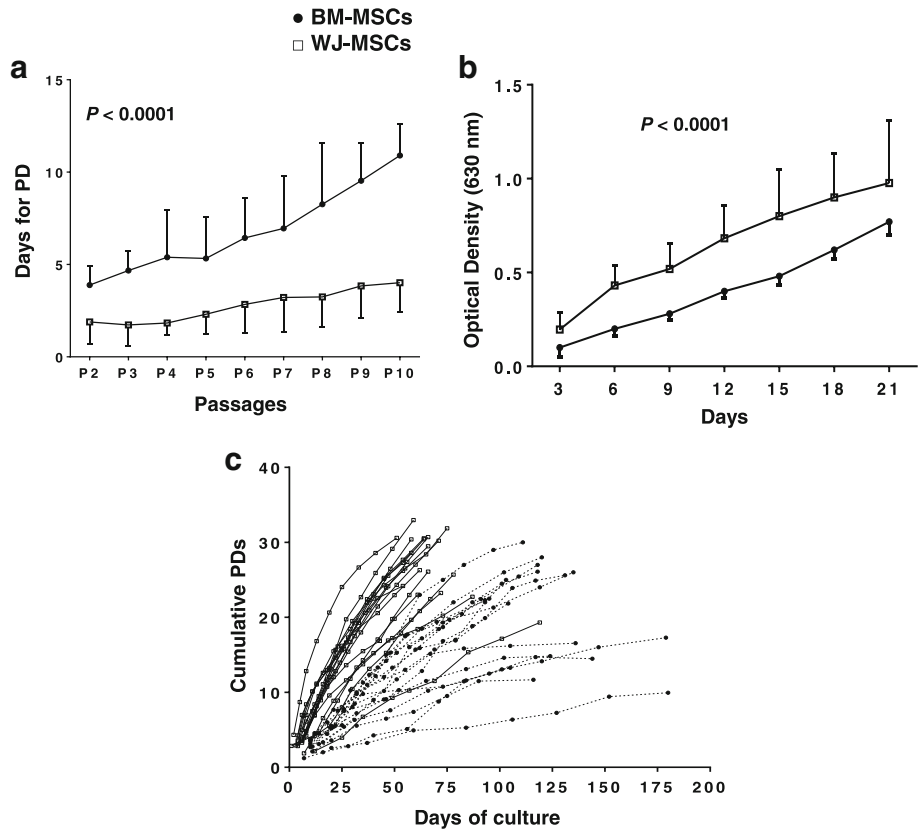


Fig. 1 Growth characteristics of BM-MSCs and WJ-MSCs. Graph **a** depicts the days (mean ± 1standard deviation) for population doubling (PD) of BM-MSCs (n = 18) and WJ-MSCs (n = 18) through passages (*P*). Graph **b** depicts the results of the optical density (mean ± 1 standard deviation) corresponding to the number of metabolically active cells over a 21-day culture using the MTT assay in MSCs at P2. Graph **c** depicts the individual long-term growth curves of BM-MSC and WJ-MSC cultures. Every cell passage is indicated by a point and the number of cumulative PDs was calculated based on the ratio of cells seeded versus cells harvested per passage. Comparison between BM- and WJ-MSCs for PD and MTT was performed by the two-way analysis of variance. Abbreviations: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *MTT* 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

in BM- compared to WJ-MSCs ($P = 0.0169$, $P = 0.0327$ and $P = 0.0001$, respectively) (Table 1). Telomere length was consistently shortened in both BM- and WJ-MSC cultures during passages and the mean relative telomere length of both BM- and WJ-MSCs at P2 was significantly higher compared to P10 ($P = 0.0208$ and $P = 0.0002$, respectively) (Table 1). However, no statistically significant difference was detected between BM- and WJ-MSC cultures in the mean telomere length of cells at P2, P6 and P10 suggesting that the reduced proliferative potential of BM-MSCs compared to WJ-MSCs cannot be attributed to accelerated telomere loss. As regards to senescence-associated gene expression, no significant difference was identified between BM- and WJ-MSCs in *PARG1*, *RB1*, *CDKN1A* and *CDKN2A* gene expression whereas a statistically significant decrease was obtained in *CDKN2B* and *TP53* gene expression in BM-MSCs throughout P2-P6-P10 ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 2). Taking together all the above data, and taking into consideration that SA-β-gal activity is neither causative nor prerequisite for manifestation of senescence [20, 21], we conclude that the inferior proliferative potential of BM-MSCs compared to WJ-MSCs cannot be attributed to premature senescence.

Upregulation of cell cycle-related genes in WJ-MSCs

We next investigated whether the above described differences in the proliferative characteristics of BM- and WJ-MSCs might be associated with differences in cell cycle distribution of cells in the culture. Indeed, at the representative P2, the proportion of cells in the quiescent G1 phase was significantly higher in BM-MSC cultures compared to WJ-MSCs (93.25 ± 1.63% and 89.54 ± 1.45%, respectively; $P < 0.0001$) (Fig. 3a). In contrast, the percentage of cells in S and G2/M phase in BM-MSC cultures (2.9 ± 2.4% and 3.85 ± 1.66%, respectively) was significantly lower compared to WJ-MSCs (3.34 ± 1.27% and 7.11 ± 0.98%, respectively) ($P = 0.0212$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 3a).To probe further the differences in the cell cycle distribution of cells in BM- and WJ-MSC cultures, we subsequently investigated the expression of genes related to cell cycle, by means of a PCR array. By considering as significant an at least two-fold difference in gene expression between WJ- and BM-MSCs [6–8], we found that 13 out of 84 cell cycle-related genes were differentially expressed between the two MSC populations at P2 (Fig. 3b). More specifically, a significant increase in aurora kinase B gene (*AURKB*; FC = 3.1) expression was observed in WJ-MSCs. This gene encodes for a protein that is associated with microtubules during chromosome movement and segregation. Cyclin D2 (*CCND2*) and cell division cycle 25 homologue A (*CDC25A*) gene expression was also upregulated in WJ-MSCs compared to BM-MSCs (FC = 4.5 and FC = 2.5, respectively). Both genes encode for proteins that regulate cell cycle G1/S transition. Furthermore, several genes encoding for cell cycle regulators of G2/M transition were also increased in WJ-MSCs, namely *CCNA2* (FC = 2.3), *CCNB1* (FC = 2.0), a gene encoding for a protein that binds to the catalytic subunit of cyclin-dependent kinases (CDC28 protein kinase regulatory subunit 2, *CKS2*; FC = 2.6), a cyclin-dependent kinase activator (cell division cycle 25C, *CDC25C*; FC = 4.2) and a gene involved in microtubule-associated process (*CDC20*; FC = 5). Moreover, *MKI67* gene, which encodes for a nuclear protein which is associated with cellular proliferation, was also increased in WJ-MSCs (FC = 2.8). In contrast, a significant decrease was obtained in WJ-MSCs compared to BM-MSCs in the expression of the antiapoptotic gene *BCL2* (FC = -4) which mediates delayed transition into S phase as well as in the cyclin-dependent kinase inhibitor-1B (*CDKN1B*; FC = -2.2), which mediates G1 arrest. An upregulation of *CDKN2B* (FC = 3.08) that mediates G1 arrest and upregulation of ataxia-telangiectasia mutated gene (*ATM*; FC = 4.03) that mediates a cell cycle delay after DNA damage, was observed in WJ-MSCs compared to BM-MSCs. Taken together all the above data suggest that WJ-MSCs display mostly an upregulation of genes that stimulate cell proliferation along with a concomitant downregulation of genes related to cell cycle inhibition, compared to BM-MSCs.

Reduced adipogenic and osteogenic differentiation potential of WJ-MSCs

To compare the adipogenic and osteogenic potential of WJ- and BM-MSCs, we induced in parallel adipogenesis

Table 1 Senescence characteristics and telomere length of WJ-MSCs and BM-MSCs

Passages	SA-β-gal positive cells (%)[a]			Mean telomere length[a]		
	WJ-MSCs	BM-MSCs	*P*	WJ-MSCs	BM-MSCs	*P*
P2	10.28 ± 5.73	25.82 ± 17	0.0169	11,958 ± 1687	10,530 ± 2244	N.S.
P6	15.14 ± 9.73	39.33 ± 22.46	0.0327	10,128 ± 1317	8901 ± 870.9	N.S.
P10	24.09 ± 11	59.14 ± 15.69	0.0001	8529 ± 1619	8212 ± 1486	N.S.

Comparisons in each indicated passage (P; P2, P6, P10) between WJ-MSCs (n = 18) and BM-MSCs (n = 18) have been performed by the nonparametric Mann–Whitney *U* test and the statistically significant *P* values are shown

Abbreviations: WJ-MSCs Wharton's jelly-mesenchymal stem cells, *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *SA-β-gal* senescence-associated β galactosidase, *N.S.* no statistically significant difference

[a]The data are expressed as means ± 1 standard deviation

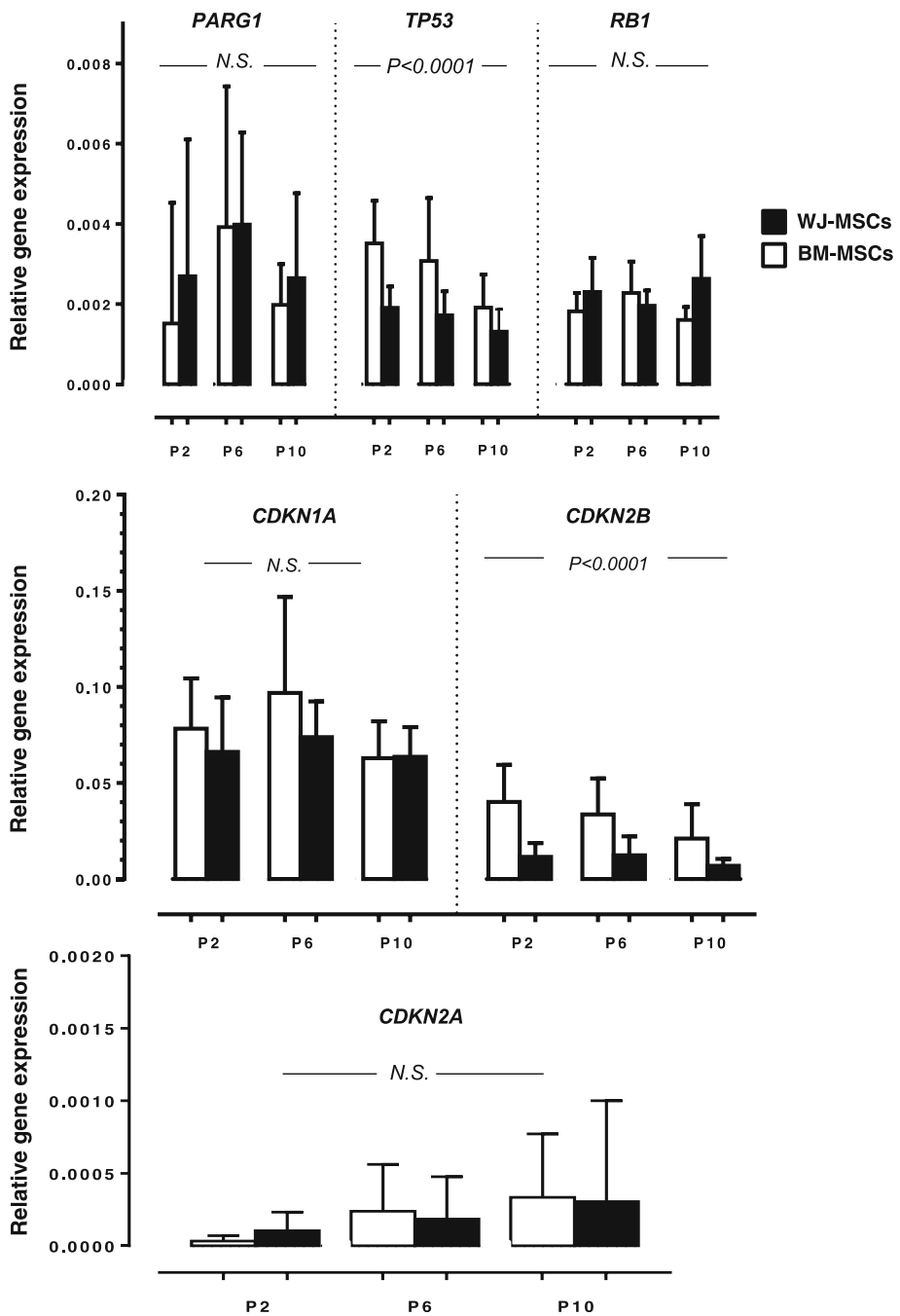


Fig. 2 Senescence-associated gene expression in BM-MSCs and WJ-MSCs. The *bars* represent the relative expression (mean + 1 standard deviation) of the senescence-associated genes *PARG1*, *TP53*, *RB1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, and *CDKN2B* in BM-MSCs (n = 18) and WJ-MSCs (n = 18) through passages (*P*). Gene expression analysis was performed by means of real-time RT-PCR using *GAPDH* as internal control gene ($2^{-\Delta Ct}$ method). Statistical analysis has been performed by the two-way analysis of variance to compare multiple mean values through P2-P6-P10. *Abbreviations*: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *N.S.* no statistically significant difference, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

and osteogenesis in P2 MSCs from both sources and assessed the specific staining reaction and the expression of adipocyte- and osteocyte-specific genes. WJ-MSCs displayed reduced adipogenic differentiation potential compared to BM-MSCs as indicated by the Oil Red O staining and by the decreased mRNA expression of *PPARG* and *CEBPA* ($P = 0.0002$ and $P = 0.0005$, respectively) (Fig. 4a). WJ-MSCs did not qualitatively differ from BM-MSCs in their capacity to differentiate into osteocytes, as indicated by Alizarin Red and Von Kossa

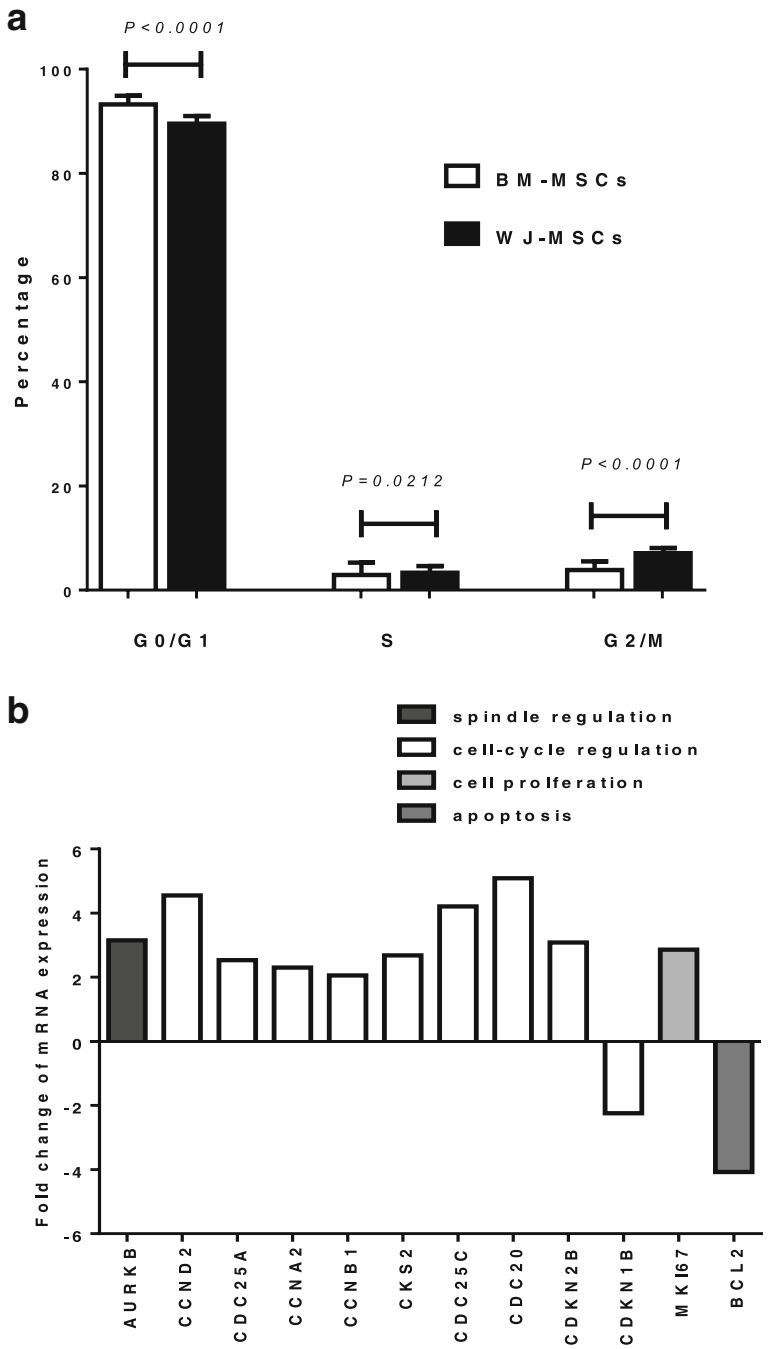


Fig. 3 Cell cycle analysis and relative expression of cell cycle-related genes in WJ-MSCs compared to BM-MSCs. **a** BM- and WJ-MSCs from P2, at a confluency of 80–90% were stained by propodium iodide and subsequently cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. *Bars* represent the proportion of cells in each phase of the cell cycle and the values shown are the means ± 1 standard deviation of $n = 18$ independent experiments. **b** The *columns* represent the mean fold change in the expression of genes related to cell cycle in WJ-MSCs ($n = 6$) at P2, compared to the respective BM-MSCs ($n = 6$), using a real-time PCR array. The fold change for each gene between the group of WJ-MSCs and the group of BM-MSCs was calculated with the ΔΔCt method and only genes exhibiting at least a two-fold change are depicted. Differentially expressed genes have been grouped according to their implication in specific cellular process such as spindle regulation, cell cycle regulation, cell proliferation, apoptosis and DNA damage response. *Abbreviations*: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *P* passage, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

staining (Fig. 4b). However, the mRNA levels of *RUNX2*, *DLX5*, *ALP* and *OSC* were significantly reduced in WJ-MSCs during osteogenic differentiation as compared to BM-MSCs ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$ and $P < 0.0097$, respectively) (Fig. 4b). Interestingly, undifferentiated WJ-MSCs (P2) expressed significantly lower levels

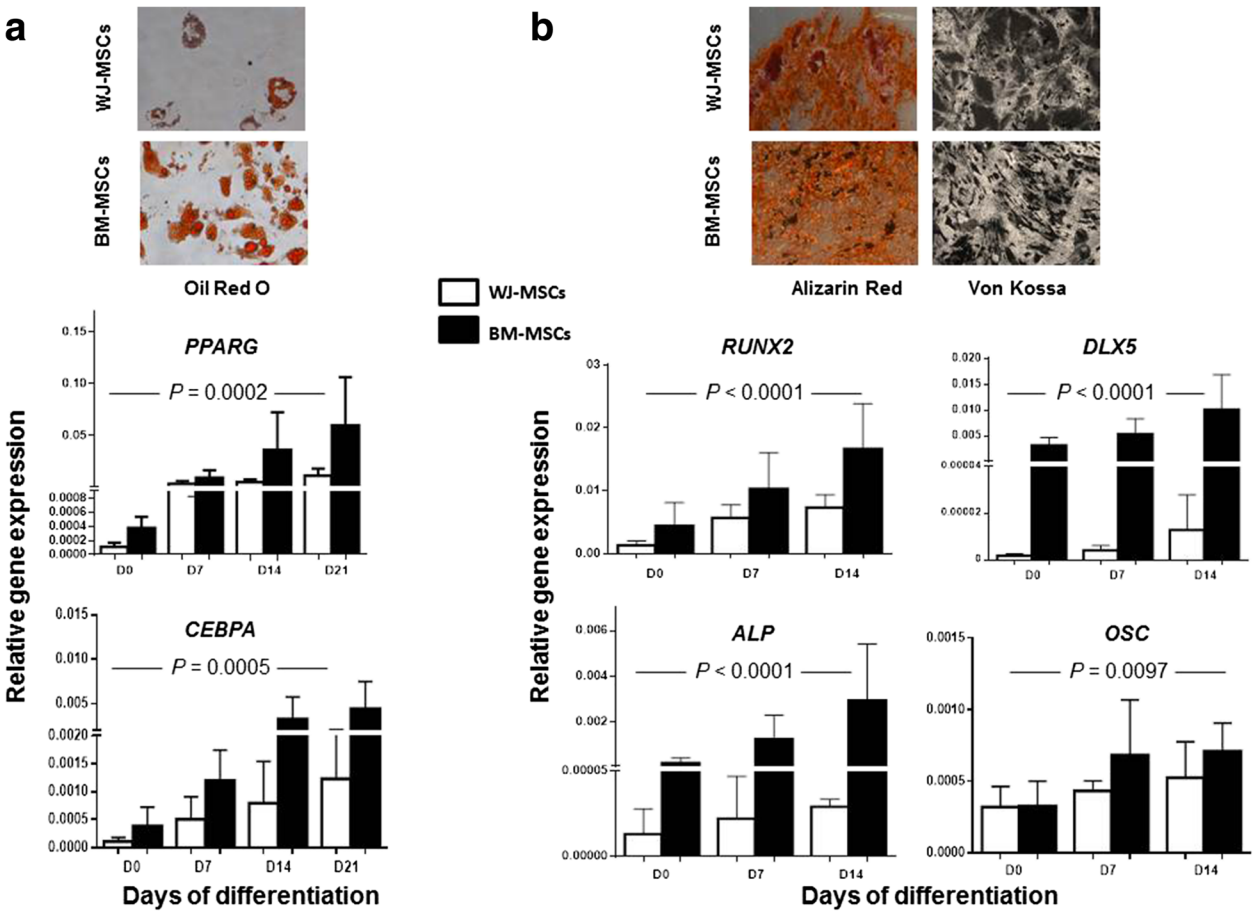


Fig. 4 Adipogenic and osteogenic differentiation of WJ-MSCs and BM-MSCs. **a** The adipogenic differentiation of WJ-MSCs and BM-MSCs was assessed by means of Oil Red O staining and real time RT-PCR for the evaluation of the adipocyte-related gene expression. The representative stained samples following adipogenic differentiation depict the inferior potential of WJ-MSCs to differentiate toward adipocytes compared to BM-MSCs. The *bars* in the graphs represent the relative expression (mean + 1 standard deviation) of *PPARG* and *CEBPA* in BM-MSCs ($n = 18$) and WJ-MSCs ($n = 18$) before differentiation induction (day 0) and at different time points during adipogenic differentiation using *GAPDH* as internal control gene ($2^{-\Delta Ct}$ method). The statistically significant differences, according to the two-way analysis of variance, are depicted. **b** The osteogenic differentiation of WJ-MSCs and BM-MSCs was assessed by means of Alizarin Red and Von Kossa staining and real time RT-PCR for the evaluation of the osteocyte-related gene expression. The representative samples following osteogenic differentiation display similar Alizarin Red and Von Kossa reactions in WJ-MSCs and BM-MSCs. The *bars* in the graphs represent the relative expression (mean + 1 standard deviation) of *RUNX2*, *DLX5*, *ALP* and *OSC* in BM-MSCs ($n = 18$) and WJ-MSCs ($n = 18$) before differentiation induction (day 0) and at different time points during osteogenic differentiation using *GAPDH* as internal control gene ($2^{-\Delta Ct}$ method). The statistically significant differences, according to the two-way analysis of variance, are depicted. *Abbreviations*: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

of *PPARG*, *CEBPA*, *RUNX2*, *DLX5* and *ALP* compared to BM-MSCs ($P = 0.0002$, $P = 0.0281$, $P = 0.0141$, $P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively), suggesting that the WJ-MSCs are less primed toward the adipocytic and osteoblastic lineages compared to BM-MSCs.

Differential expression of WNT signaling molecules between WJ- and BM-MSCs

The WNT pathway is involved in the differentiation and proliferation process of MSCs [22]. We have therefore evaluated the expression of genes encoding proteins of the WNT pathway in WJ- and BM-MSCs using a PCR array. We found that expression of 25 out of 84 WNT-related genes displayed at least a two-fold difference between WJ- and BM-MSCs (Fig. 5a). Specifically, five genes encoding for WNT proteins were significantly downregulated in WJ-MSCs (*WNT3A*, FC = -2.4; *WNT5A*, FC = -2.3; *WNT5B*, FC = -3.4; *WNT7B*, FC = -2.6; *WNT8A*, FC = -2.2) as well as four genes encoding for WNT receptors (*FZD1*, FC = -4; FZD3, FC = -11.4; *FZD4*, FC = -5.4; *FZD5*, FC = -3.2). Two genes implicated in the canonical WNT signaling were downregulated (*AXIN2*, FC = -2.6; porcupine homologue 1 -*PORCN1*, FC = -2.4), whereas two genes involved in the non-canonical WNT signaling were upregulated (dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 -*DAAM1*,

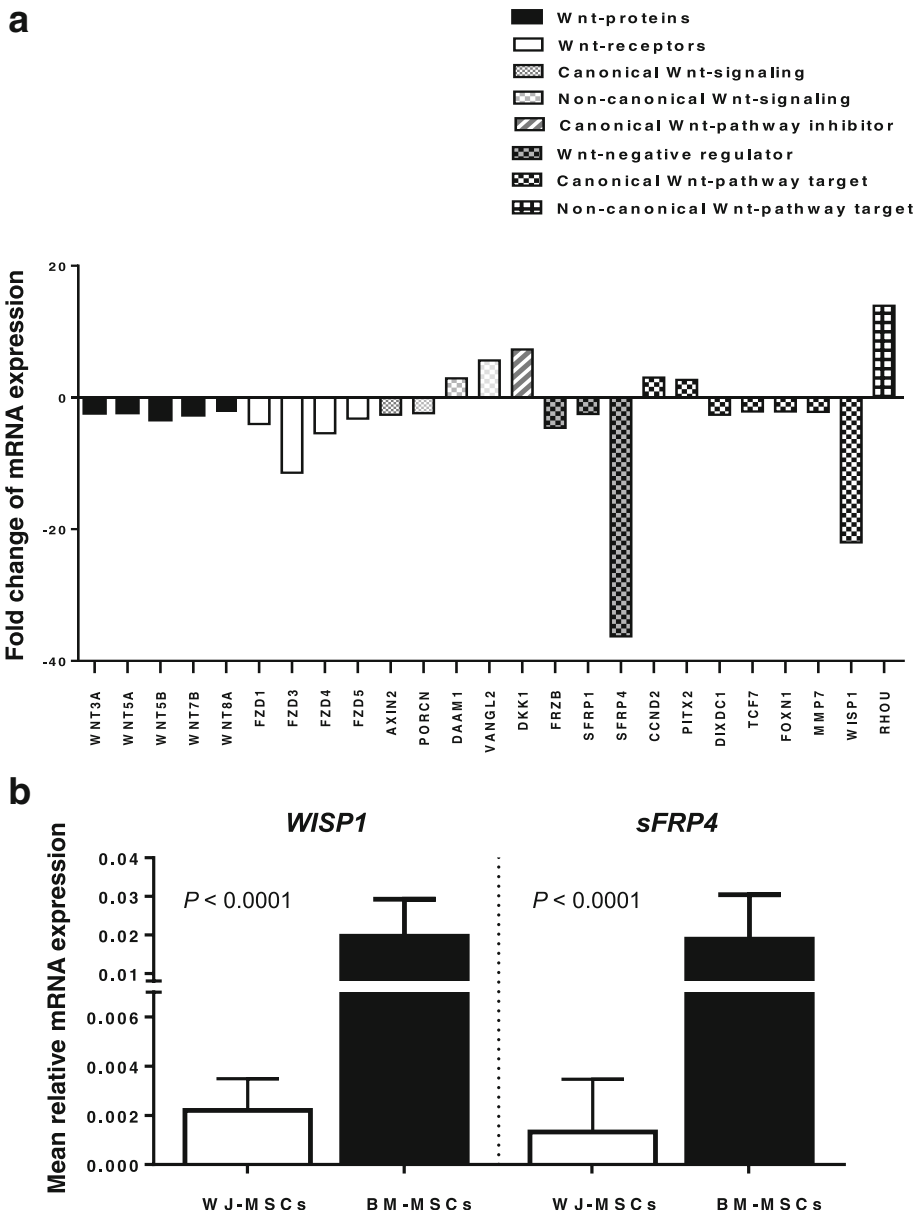


Fig. 5 Relative expression of genes related to WNT pathway in WJ-MSCs and BM MSCs. **a** The *columns* represent the mean fold change of genes involved in WNT signaling in P2 WJ-MSCs ($n = 6$) as compared to BM–MSCs ($n = 6$) using a real-time PCR array. Only genes exhibiting at least a two-fold change in their expression are depicted. **b** Validation of the array. The *bars* represent the relative mRNA expression (mean + 1 standard deviation) of *WISP1* and *sFRP4* in WJ-MSCs ($n = 18$) and BM-MSCs ($n = 18$) at P2 using real-time RT-PCR. Values correspond to $2^{-\Delta Ct}$ using *GAPDH* as control gene. Comparisons between WJ- and BM-MSCs were performed by the nonparametric Mann-Whitney *U* test and the *P* values are depicted. *Abbreviations*: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *sFRP4* secreted frizzled related protein 4, *WISP1* WNT1-inducible-signaling pathway protein 1, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

FC = 2.9; Vang-like 2 -*VANGL2*, FC = 5.6) in WJ-MSCs. The gene encoding for the canonical WNT pathway inhibitor dickkopf-1 (*DKK1*) was significantly upregulated (FC = 7.3), while the WNT negative regulators *FRZB*, *sFRP1* and *sFRP4* were decreased (FC = -4.6, FC = -2.5, FC = -36.2, respectively) in WJ-MSCs. The canonical WNT pathway targets DIX domain containing 1 (*DIXDC1*), transcriptional factor-7 (*TCF7*), forkhead box protein N1 (*FOXN1*), matrix metalloproteinase-7 (*MMP7*) and *WISP1* were significantly downregulated in WJ-MSCs (FC = -2.6, FC = -2.1, FC = -2.1, FC = -2.2 and FC = -22, respectively). The expression of *CCND2* and its activator Pituitary homeobox 2 (*PITX2*), which also encode targets of the canonical WNT pathway were significantly increased in WJ-MSCs (FC = 3; and FC = 2.7, respectively). Finally, the expression of the non-

canonical WNT target Ras Homolog Family Member U (*RHOU*) gene was significantly increased in WJ-MSCs (FC = 13.9).

Taken together, all the above data suggest that the canonical WNT pathway is downregulated in WJ-MSCs as evidenced by the downmodulation of canonical WNTs, WNT receptors and canonical WNT targets, as well as the upregulation of the WNT/β-catenin signaling inhibitor *DKK1*. We speculate that the reduced expression of the WNT inhibitors/negative regulators *sFRP1*, *FRZB (sFRP3)*, *sFRP4* and *AXIN2* may represent a compensatory phenomenon aiming to upregulate the canonical WNT signaling. The upregulation of genes involved in the non-canonical WNT pathway in WJ-MSCs is also anticipated because the canonical and non-canonical WNT signaling are generally antagonistic [23].

To validate the results obtained from the PCR array, we evaluated the expression of genes with the greatest FC, namely *WISP1* and *sFRP4*, by real-time RT-PCR in P2 WJ-MSCs (n = 18) and BM-MSCs (n = 18). In accordance with the PCR array, the mean relative mRNA expression of both *WISP1* and *sFRP4* was significantly decreased in WJ-MSCs (0.0022 ± 0.0013 and 0.0013 ± 0.002, respectively) compared to BM-MSCs (0.019 ± 0.009 and 0.018 ± 0.01, respectively) ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 5b).

sFRP4 is implicated in the adipogenic differentiation of WJ-MSCs

Secreted-FRP4 is a WNT inhibitor that directly binds WNTs, antagonizing therefore both canonical and non-canonical WNT pathways [24]. It has been reported that rh-sFRP4 may induce adipogenesis of adipose tissue-derived MSCs in vitro [25]. We have therefore investigated whether the profound downregulation of *sFRP4* mRNA expression in WJ-MSCs compared to BM-MSCS (FC = -36.2), might explain the decreased adipocytic differentiation potential of the cells, at least in part. We first evaluated the *sFRP4* gene expression during adipogenic differentiation of WJ-MSCs (n = 5) and we indeed found a gradual statistically significant increase in mRNA levels' time course (Fig. 6a). Specifically, *sFPR4* mRNA expression at day 14 was significantly higher compared to baseline and day 7 ($P = 0.022$ and $P = 0.022$, respectively).

We next cultured WJ-MSCs in adipocytic medium for 7 days in the absence or presence of 20 nM rh-sFRP4 and evaluated the mRNA levels of the adipogenesis-specific genes *PPARG* and *CEBPA*. As shown in Fig. 6b, at day 7 of adipogenic differentiation, WJ-MSC cultures treated with rh-sFRP4 displayed significant upregulation of the above genes compared to untreated cultures ($P = 0.012$ and $P = 0.003$, respectively) or cultures prior to adipogenic induction ($P = 0.0002$ and $P < 0.0001$, respectively).

WISP1 is implicated in the osteogenic differentiation of WJ-MSCs

It has been shown that WISP1 promotes the osteogenic differentiation of BM-MSCs and *WISP1* gene expression has been reported to increase during BM-MSC osteogenic differentiation in vitro [26–28]. In accordance with these reports, we also observed a statistically significant upregulation of *WISP1* mRNA expression in WJ-MSCs during osteogenic differentiation (Fig. 6a). Specifically, *WISP1* mRNA expression at day 14 was significantly higher compared to baseline and day 7 ($P = 0.0095$ and $P = 0.0286$, respectively).

To investigate whether the downregulation of *WISP1* mRNA expression in WJ-MSCs compared to BM-MSCs might have a role in the reduced osteogenic differentiation potential of WJ-MSCs, we cultured WJ-MSCs ($n = 5$) in osteogenic medium for 7 days in the absence or presence of 50 ng/ml rh-WISP1 and we next evaluated the mRNA levels of the osteogenesis-specific genes *RUNX2, ALP* and *OSC*. As shown in Fig. 6c, rh-WISP1 treatment resulted in a significant upregulation of these genes compared to untreated WJ-MSCs ($P = 0.026$, $P = 0.0232$ and $P = 0.0079$, respectively) or compared to WJ-MSCs prior to osteogenic induction ($P = 0.0002$, $P = 0.0004$ and $P = 0.0043$, respectively).

WJ-MSCs exhibit inferior hematopoiesis-supporting potential than BM-MSCs

To evaluate the capacity of WJ- and BM-MSCs to support the hematopoietic progenitor cell growth, we assessed the clonogenic potential of the NAC fraction of irradiated (P2) confluent WJ-MSC ($n = 6$) and BM-MSC ($n = 6$) cultures. The frequency of the total CFUs obtained by the NACs was significantly lower in cultures with feeder layers from WJ-MSCs compared to BM-MSCs, irrespectively of the source of the recharging $CD34^+$ cells, i.e., BM ($P = 0.0008$) (Fig. 7a) or UCB ($P < 0.0001$) (Fig. 7b). More specifically, the increased CFU numbers in cultures of BM-MSCs compared to the respective of WJ-MSCs, was due to the increased number of both CFU-E and total CFU-GM progenitor cells derived from either BM-$CD34^+$ cells ($P = 0.0435$ and $P = 0.0001$, respectively) (Fig. 7a) or UCB-$CD34^+$ cells ($P = 0.0007$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 7b). Interestingly, both WJ- and BM-MSC feeder layers exhibited superior hematopoiesis-supporting capacity when recharged with UCB-$CD34^+$ cells than BM-$CD34^+$ cells, as indicated by the evaluation of the total CFU numbers ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively).

To probe further the hematopoiesis-supporting potential of WJ- and BM-MSCs, we analyzed several common hematopoietic cytokines, namely FLT3L, SDF-1α, G-SCF and GM-CSF in P2, P6 and P10 supernatants from WJ-MSC ($n = 18$) and BM-MSC ($n = 18$) cultures. As shown in Table 2, FLT3L levels did not differ significantly

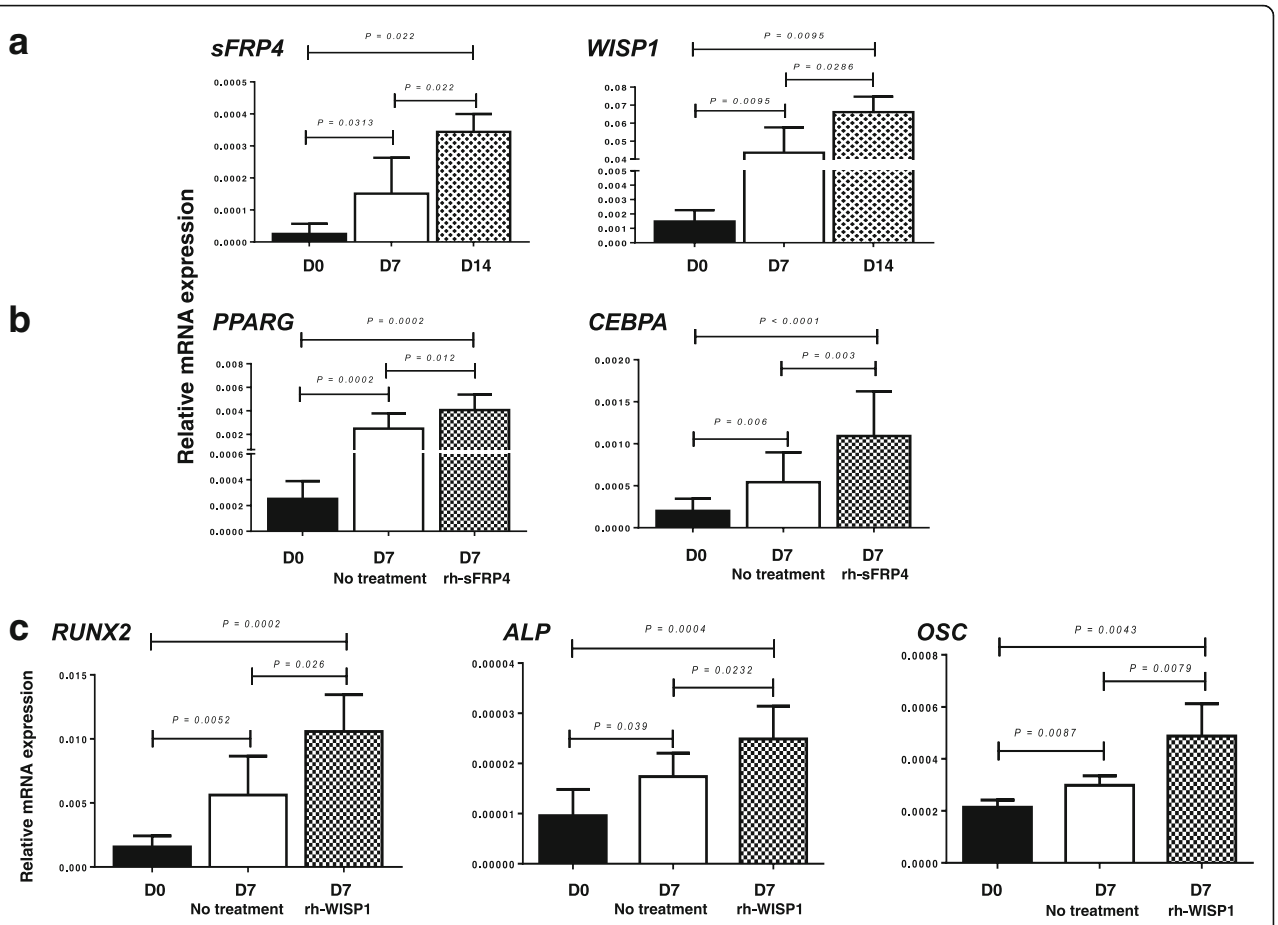


Fig. 6 The role of sFRP4 and WISP1 in the adipogenic and osteogenic differentiation of WJ-MSCs. Graph **a** depicts the relative expression (mean + 1 standard deviation) of *sFRP4* and *WISP1* gene expression in WJ-MSCs at different time points during adipogenic and osteogenic differentiation respectively. Graph **b** depicts the relative expression (mean + 1 standard deviation) of the adipocyte-associated genes *PPARG* and *CEBPA* following induction of adipogenic differentiation of WJ-MSCs in the absence or presence of 20nM rh-sFRP4. Graph **c** shows the relative expression (mean + 1 standard deviation) of the osteocyte-associated genes *RUNX2, ALP* and *OSC* following induction of osteogenic differentiation of WJ-MSCs in the absence or presence of 50 ng/ml rh-WISP1. In all cases, evaluation of gene expression was performed by means of real-time RT-PCR using *GAPDH* as control. Comparisons in gene expression between different time points and between treated and untreated cultures were performed by means of the non-parametric Mann–Whitney *U* test. *Abbreviations*: *rh-sFRP4* recombinant human secreted frizzled-related protein 4, *rh-WISP1* recombinant human WNT-induced secreted protein 1, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

between WJ- and BM-MSC cultures whereas SDF-1α levels were significantly decreased in WJ- compared to BM-MSC culture supernatants throughout passages ($P = 0.0012$). G-CSF and GM-CSF were detectable in WJ-MSC supernatants through passages but were undetectable in the respective BM-MSC cultures ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively). These data suggest that the inferior hematopoiesis-supporting capacity of WJ-MSCs compared to BM-MSCs is unlikely to be associated with impaired production of hematopoiesis-inducing cytokines, but may be associated with the lower production of SDF-1α, at least in part.

Discussion

WJ-derived MSCs have gained much attention over the last years for potential use in cell-based therapies, since they can be easily isolated without any ethical concerns from a tissue which is discarded after birth [3]. In the present study, we have performed a rigorous side-by-side comparison of WJ-MSCs with BM-MSCs, which represents the most extensively studied MSC population. We even excluded the possible contamination of WJ-MSCs by diverse MSC populations from different UC regions, i.e., perivascular and sub-amnion, by stripping the UC vessels before cutting the WJ into pieces and use them as explants for culture establishment. Various biological properties of the two MSC populations were comparatively studied in parallel experiments, including the expression of cell cycle and WNT pathway-related genes, which have never been studied before. The involvement of WNT pathway-related molecules in the differentiation capacity of WJ-MSCs were also studied for the first time.

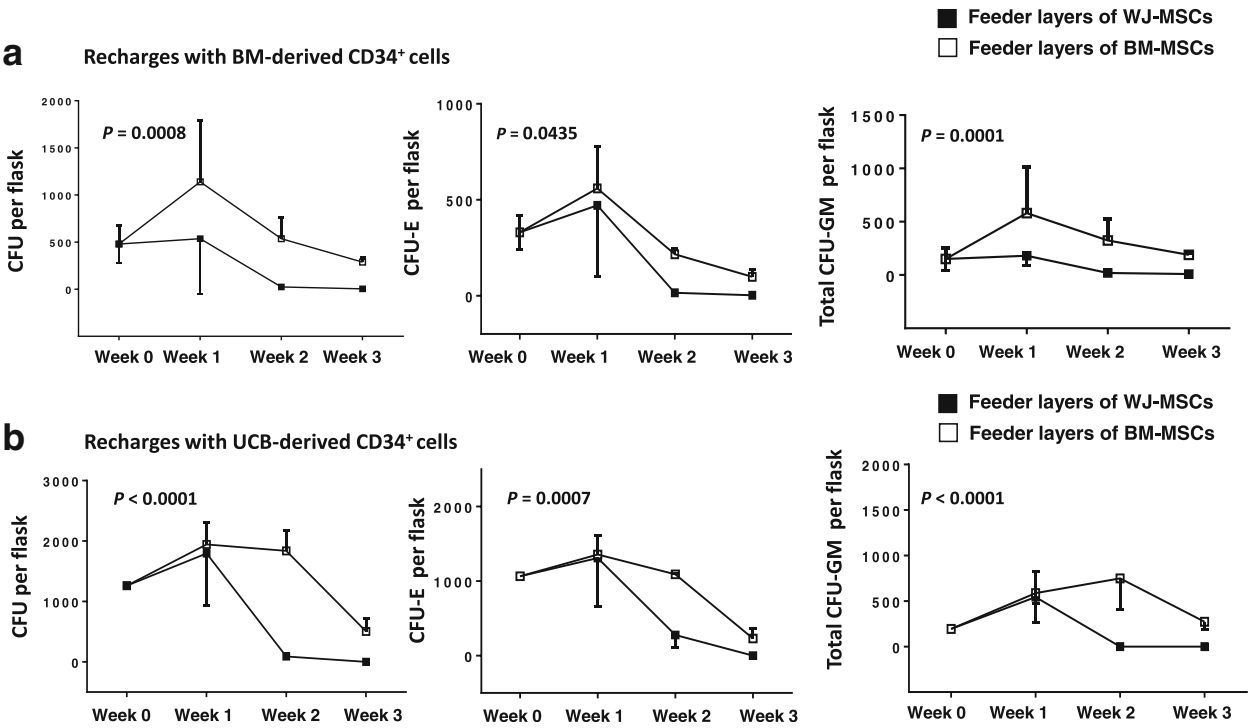


Fig. 7 The hematopoiesis-supporting capacity of WJ-MSCs and BM-MSCs. Confluent stromal layers from WJ-MSCs ($n = 6$) and BM-MSCs ($n = 6$) at P2 grown in 25cm^2 flasks, were irradiated and recharged with normal allogeneic BM-derived (**a**) or UCB-derived (**b**) CD34$^+$ cells. At weekly intervals for a total of 3 weeks, cultures were fed by demi-depopulation and the non-adherent cells were assayed for clonogenic progenitor cells in methylcellulose culture medium. The graphs depict the number (mean ± 1 standard deviation) of total colony-forming units (*CFU*), erythroid colony-forming units (*CFU-E*) and total granulocyte-macrophage colony-forming units (*CFU-GM*) time course obtained from the non-adherent cell fraction of recharged WJ-MSC or BM-MSC cultures. Comparison of mean colony numbers over the 3-week culture between WJ- and BM-MSC feeder layers was performed by the two-way analysis of variance and the *P* values are depicted. *Abbreviations*: *BM-MSCs* bone marrow-mesenchymal stem cells, *UCB* umbilical cord blood, *WJ-MSCs* Wharton's jelly-mesenchymal stem cells

Ex vivo expanded WJ-MSCs showed similar fibroblast-like morphology and immunophenotypic characteristics compared to BM-MSCs. However, the growth rate of WJ-MSCs over passages was significantly increased compared to BM-MSCs, as was demonstrated by the PD time through passages and the metabolic activity of cells at a representative passage (P2). Our data on the survival characteristics of MSCs suggest that the differential growth of the two MSC populations cannot be attributed to differences in the rate of apoptotic cell death but may be associated to the increased proliferation of WJ-MSCs, at least in part. Indeed, significant higher proportion of WJ-MSCs was found in S and G2/M phase of cell cycle in flow cytometric analysis, compared to BM-MSCs, and this finding was associated with alterations in the expression of genes involved in G1/S and G2/M transition.

Table 2 Cytokines in MSC culture supernatants

Cytokines[a]	WJ-MSC culture supernatants (n = 18)			BM-MSC culture supernatants (n = 18)			
	P2	P6	P10	P2	P6	P10	*P* value
FLT3L (ng/mL)	13.79 ± 0.75	14.35 ± 1.24	13.74 ± 0.87	13.77 ± 0.96	14.70 ± 6 2.33	13.43 ± 0.45	N.S.
SDF1-α (ng/mL)	1189.00 ± 380.40	1159.00 ± 401.00	1032.00 ± 269.00	2074.00 ± 1247.00	1607.00 ± 698.00	1369.00 ± 420.60	0.0012
G-CSF (ng/mL)	108.30 ± 100.70	578.00 ± 409.80	388.00 ± 360.00	N.D.	N.D.	N.D	<0.0001
GM-CSF (ng/mL)	12.19 ± 9.46	145.20 ± 135.60	37.70 ± 13.58	N.D.	N.D.	N.D.	0.0002

Cytokine measurements have been performed by means of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Comparisons in cytokine levels between WJ-MSCs and BM-MSC supernatants through passages (P) P2-P6-P10, were performed by two-way analysis of variance and the statistically significant *P* values are shown
Abbreviations: WJ-MSCs Wharton's jelly-mesenchymal stem cells, *BM-MSCs* bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *P* passage, *FLT3L* FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, *SDF-1α* stromal cell-derived factor-1α, *G-CSF* granulocyte colony-stimulating factor, *GM-CSF* granulocyte-macrophage colony -stimulating factor, *N.S.* no statistically significant difference, *N.D.* not detected
[a]The data are expressed as means ± 1 standard deviation

Specifically, an upregulation of *CCND2*, *CDC25A*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CDC28*, *CKS2*, *CDC25C*, *CDC20* and *AURKB* was found in WJ-MSCs compared to BM-MSCs that was associated with downregulation of the anti-apoptotic gene *BCL2*, which mediates delayed transition into S phase, and downregulation of *CDKN1B*, which is implicated in G1 arrest. To the best of our knowledge, comparative analysis of cell cycle-related genes between WJ-MSCs and BM-MSCs has not been previously reported and the results give an explanation for the increased growth rate of the WJ-MSCs in comparison to their BM counterparts.

Since replicative senescence has been associated with defective cellular proliferative capacity, we investigated whether the inferior growth of BM-MSCs throughout culture might be due to increased propensity to cell senescence compared to WJ-MSCs. However, the expression of three cell cycle inhibitors which are usually upregulated in senescent cells, namely *RB1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, as well as the expression of the senescence associated-gene *PARG1* known to increase during passages [29, 30], did not differ significantly between the two MSC populations at P2-P6-P10. *TP53* was found overexpressed in WJ-MSCs compared to BM-MSCs. However, *TP53* is not solely associated to cell senescence but also functions as a guard of the genome by inhibiting the cell cycle and therefore allowing the time for repair of potential DNA damage [31]. Based on the increased proliferation potential of WJ-MSCs, one may hypothesize that the upregulation of *TP53* may act a safety mechanism, ensuring that these cells will not accumulate genomic instability during successive divisions.

Telomere length has been recognized as the main indicator of MSC replicative senescence [21, 32]. The mean telomere length did not differ significantly between WJ- and BM-MSCs through passages, suggesting further that cell senescence is unlikely to account for the inferior proliferative potential of BM-MSCs. In contrast to the aforementioned observations, the number of SA-β-gal-positive cells was significantly higher in BM-MSC cultures compared to WJ-MSCs throughout passages. Nevertheless, SA-β-gal activity, although associated, is not completely specific for senescence [33, 34]. Instead, it can give false-positive results when used as the sole method to identify senescence and should therefore be interpreted in combination with other biomarkers [33, 34]. However, given that the expression of SA-β-gal has been mostly associated with a non-proliferative state [34], the increased proportion of SA-βgal-positive cells, may have a role in the decreased proliferative characteristics of BM- compared to WJ-MSCs.

The use of MSCs in cell-based therapies may require large-scale ex vivo expansion. To investigate whether long-term culture may influence the genetic stability of WJ-MSCs, we performed cytogenetic analysis of WJ- and BM-MSCs through passages. Clonal cytogenetic aberrations were detected in WJ-MSCs from 2/18 (11.11%) samples [del(1)(p34) and add(2)(p25.3)] and in BM-MSCs from 3/18 (16.67%) samples (trisomy 5). Notably in all cases, MSCs showed progressive growth arrest and eventually entered senescence. Our findings are in line with previous reports suggesting that BM-MSCs may occasionally develop genetic aberrations after long-term culture, without evidence of malignant transformation whatsoever [35–37]. As regards WJ-MSCs, contradictory results have been reported so far for the genomic stability of UC-derived MSCs [38–42]. The inconsistencies are probably related to the variability of MSC populations, culture conditions and methodologies (classical karyotype, FISH or comparative genomic hybridization array). Nevertheless, on the basis of our findings, BM-MSCs and WJ-MSCs develop chromosomal aberrations at the same rate when expanded under the same experimental conditions and karyotypic analysis of culture-expanded MSCs is reasonable before any application of cells in the clinic.

With regards to the ex vivo differentiation potential, WJ-MSCs displayed inferior adipogenic capacity compared to BM-MSCs, as evidenced by the Oil Red O staining and the expression of adipogenesis-specific genes *PPARG* and *CEBPA*. The WJ-MSCs also displayed reduced osteogenic potential compared to BM-MSCs, as evidenced by the lower expression of the osteogenesis-related genes *RUNX2*, *DLX5*, *ALP* and *OSC* despite the similar Von Kossa and Alizarin Red staining. The above findings are in line with previous reports indicating reduced differentiation capacity of WJ-MSCs toward adipocytes and osteocytes [43–45]. In our study, we also showed decreased expression of osteogenesis- and adipogenesis-related genes in undifferentiated WJ-MSCs at P2 compared to BM-MSCs, suggesting an inferior lineage priming of WJ-MSCs to osteoblastic and adipocytic lineages.

Because mechanisms accounting for the weak differentiation potential of WJ-MSCs toward adipocytes and osteocytes have not been elucidated thus far and based on the established role of the WNT signaling pathway in MSC differentiation [46–49], we comparatively investigated the expression profile of genes associated with this pathway in BM- and WJ-MSCs. Twenty-five out of 84 genes were found to be differentially expressed between the two cell populations. Although the functional significance of these differences remains to be fully elucidated, we speculate that the differential expression of the WNT pathway-associated molecules has probably a role in the inferior osteogenic and adipogenic potential of WJ-MSCs compared to BM-MSCs. Indeed, *WNT3A*, *-5A* and *-7B* known to promote osteogenesis [46, 47] were

downregulated, whereas the canonical WNT pathway negative regulator *DKK1*, known to inhibit osteogenesis [46], was upregulated in WJ-MSCs. Furthermore, based on the finding of significant downregulation of *WISP1* in WJ- compared to BM-MSCs and also on previously reported data on the role of this molecule in osteoblastic differentiation in vitro and osteogenesis in vivo [26, 27], we studied its significance in the osteogenic differentiation of WJ-MSCs. The upregulation of *WISP1* expression during the osteogenic differentiation of WJ-MSCs in association with the finding that treatment with rh-WISP1 resulted in induction of the osteogenic potential of WJ-MSCs, as was evidenced by the upregulation of *RUNX2*, *ALP* and *OSC* expression, corroborates the assumption that the downregulation of *WISP1* in WJ-MSCs compared to BM-MSCs is probably implicated in their inferior differentiation capacity toward the osteoblastic lineage.

The implication of WNT signaling pathway in the adipogenic differentiation of MSCs has been previously reported [48, 49]. In this context, and because *sFRP4*, a molecule known to be implicated in adipogenesis [25, 50], was found significantly downregulated in WJ-MSCs compared to BM-MSCs, we investigated the potential role of *sFRP4* in the adipogenic differentiation of WJ-MSCs. The increase of *sFRP4* mRNA during the adipogenic differentiation of WJ-MSCs in association with the finding that treatment with rh-sFRP4 resulted in induction of the adipogenic potential of WJ-MSCs, as was indicated by the upregulation of *PPARG* and *CEBPA* expression, favors the hypothesis that the downregulation of *sFRP4* in WJ-MSCs compared to BM-MSCs is probably implicated in their inferior differentiation capacity toward adipocytes. The involvement of *WISP1* and *sFRP4* on the differentiation potential of WJ-MSCs provide novel insights on the role of WNT signaling in this MSC population.

Limited data are currently available on the hematopoiesis-supporting capacity of WJ-MSCs compared to BM-MSCs [51, 52]. To probe this issue, we recharged in parallel WJ- and BM-MSC stromal layers with the same batch of UCB- or BM-derived $CD34^+$ cells and subsequently evaluated the capacity of the stromal cells to support the clonogenic potential of the supernatant $CD34^+$ cells, over 3 weeks. We found that feeder layers derived from WJ-MSCs displayed an inferior potential to support myeloid and erythroid colony formation by the supernatant hematopoietic cells, compared to BM-MSCs. This observation corroborates a previous report [51], whereas it contradicts another study which detected no difference in the hematopoiesis-supporting function of UC- and BM-MSCs [52]. This controversy might be attributed, at least in part, to the fact that in the latter study MSCs from the whole UC were used as feeder layers.

The observed differences in the hematopoiesis-supporting capacity of WJ- compared to BM-MSCs might be due, at least in part, to the different cytokine production. In line with a previous report [53], we have also shown that WJ-MSCs secrete lower SDF-1α and higher G-CSF and GM-CSF amounts, compared to BM-MSCs. We assume that the increased levels of G-CSF and GM-CSF may not be able to functionally counterbalance the decreased production of SDF-1α by the WJ-MSCs [54, 55]. The differential expression of the WNT pathway-related molecules between WJ- and BM-MSCs may also have a role in the different hematopoiesis-supporting function of these two MSC populations. For example, the canonical WNT pathway, which was downregulated in WJ-MSCs, has been reported to display a positive effect [56], whereas the canonical pathway inhibitor DKK1, which was upregulated in WJ-MSCs, has been reported to exert a negative effect on the hematopoietic progenitor cell growth [57]. Interestingly, both WJ- and BM-MSCs were less effective in supporting the growth of the BM-derived than the UCB-derived $CD34^+$ cells probably because the BM hematopoietic stem/progenitor cell fraction contains less primitive and fewer clonogenic cells compared to UCB [58].

Conclusions

Overall, we have performed a rigorous, head-to-head comparison of ex vivo expanded WJ-MSCs and BM-MSCs and have provided insights in their immunophenotypic, survival, proliferative and cytogenetic characteristics, their differentiation potential and their capacity to support hematopoiesis. We have provided, for the first time, evidence for differential expression of cell cycle and WNT pathway-related molecules that may significantly contribute to the observed differences in the biological properties of the two MSC populations. We have also pointed out the prominent role of the WNT pathway-related molecules *WISP1* and *sFRP4* in the osteogenic and adipogenic differentiation potential of WJ-MSCs. These data contribute to the better characterization of WJ-MSCs and BM-MSCs in view of their use in the clinic and even encourage the probability of engineering the WNT pathway in WJ-MSCs for specific clinical applications.

Abbreviations

7-AAD: 7-aminoactinomycin D; ALP: Alkaline phosphatase; BM: Bone marrow; CDKN: Cyclin-dependent kinase; CEBPA: CCAAT/enhancer-binding protein alpha; CFU: Colony-forming units; DLX5: Distal-less homeobox protein 5; FC: Fold change; FLT3L: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MSC: Mesenchymal stem cells; MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; NACs: Non-adherent cells; OSC: Osteocalcin; P: Passage; PARG1: Phosphate-associated RhoGAP protein-tyrosine; PD: Population doubling; PPARG: Peroxisome proliferator activated receptor-γ; RB1: Retinoblastoma; RT-PCR: Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; RUNX2: Runt-related

transcription factor 2; SA-β-gal: Senescence-associated β-galactosidase; SDF-1α:
Stromal cell-derived factor-1α; sFRP4: Secreted frizzled related protein 4; UC: Umbilical cord; UCB: Umbilical cord blood; WISP1: WNT1-inducible-signaling pathway protein 1; WJ: Wharton's jelly

Acknowledgements
We are grateful to the patients and mothers who gave their consent for donation of BM and UC samples, respectively.

Funding
This work was supported by the European Commission FP7 programme "Translational Potential" (TransPOT; EC contract number 285948) and a grant by the General Secretariat of Research and Technology, Greece (UMBISTEM; SYNERGASIA 11SYN_10_668).

Availability of data and materials
The datasets supporting the results of this article are included within the article.

Authors' contributions
AKB performed the experiments, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript. CP supervised and interpreted the experiments, analyzed the data and contributed in the drafting of the manuscript. DK provided the umbilical cord samples and critically reviewed the manuscript. KIP, AD and EK performed experiments. IM performed experiments and critically reviewed the manuscript. KA and GK provided the bone marrow samples and critically reviewed the manuscript. HAP designed the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication
Not applicable.

Ethics approval and consent to participate
The study has been approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion (reference number 1724/20-03-2012) and informed consent for the UC and the BM donation was obtained from the neonate mothers and the individuals undergoing surgery, respectively, according to the Helsinki Protocol.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece. [2]Graduate Program "Molecular Basis of Human Disease", University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece. [3]Department of Obstetrics and Gynecology, University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece. [4]Department of Orthopedics and Traumatology, University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece.

Received: 1 February 2017 Revised: 14 March 2017
Accepted: 5 April 2017 Published online: 26 April 2017

References

1. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang. 2010;98:93–107.
2. Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's ielly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. Curr Stem Cell Res Ther. 2013;8:144–55.
3. Wegmeyer H, Broske AM, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, et al. Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. Stem Cells Dev. 2013;22:2606–18.
4. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. 2008;26:591–99.
5. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton's jelly compartment provides the best source of clinically utilizable mesenchymal stem cells. PloS One. 2015;10, e0127992.
6. Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehman S, Kritikos H, et al. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2008;67:741–49.
7. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, et al. Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway. Stem Cells Dev. 2014;23:1568–81.
8. Chatzinikolaidou M, Kaliva M, Batsali A, Pontikoglou C, Vamvakaki M. Wharton's jelly mesenchymal stem cell response on chitosan-graft-poly (epsilon-caprolactone) copolymer for myocardium tissue engineering. Curr Pharm Des. 2014;20:2030–39.
9. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. Blood. 1996;87:2244–51.
10. Pontikoglou C, Kastrinaki MC, Klaus M, Kalpadakis C, Katonis P, Alpantaki K, et al. Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Stem Cells Dev. 2013;22:1329–41.
11. Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, Martin BG, Beck JC. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:10614–19.
12. Pavlaki KI, Kastrinaki MC, Klontzas M, Velegraki M, Mavroudi I, Papadaki HA. Abnormal telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells and granulocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia. Haematologica. 2012;97:743–50.
13. Debacq-Chainiaux F, Boilan E, Le Dedessus MJ, Weemaels G, Toussaint O. p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. Adv Exp Med Biol. 2010;694:126–37.
14. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. Methods Mol Med. 2007;140:67–81.
15. Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki MC, Fragioudaki P, Giannkiou K, Psyllaki M, et al. Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. Stem Cells Dev. 2010;19:1043–54.
16. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2013.
17. Kouvidi E, Stratigi A, Batsali A, Mavroudi I, Mastrodemou S, Ximeri M, et al. Cytogenetic evaluation of mesenchymal stem/stromal cells from patients with myelodysplastic syndromes at different time-points during ex vivo expansion. Leuk Res. 2016;43:24–32.
18. Coutinho LH, Gilleece MH, De Wynter EA, Will A, Testa NG. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In: Testa NG, Molineux G, editors. Haemopoiesis: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 75–106.
19. Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, Gemetzi C, Damiamaki A, Koutala H, et al. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. Blood. 2003;101:2591–600.
20. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. Aging Cell. 2006;5:187–95.
21. Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Joussen S, Ma N, Strunk D, et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? Aging (Albany NY).
2010;2:224–30.
22. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. Gene. 2009;433:1–7.
23. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. Genes Dev. 2014;28:1517–32.
24. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci. 2003;116:2627–34.
25. Visweswaran M, Schiefer L, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 4 upregulates adipogenic differentiation in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. PloS One. 2015;10, e0118005.
26. Inkson CA, Ono M, Kuznetsov SA, Fisher LW, Robey PG, Young MF. TGF-beta1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function. J Cell Biochem. 2008;104:1865–78.

27. Ono M, Inkson CA, Kilts TM, Young MF. WISP-1/CCN4 regulates osteogenesis by enhancing BMP-2 activity. J Bone Miner Res. 2011;26:193–208.
28. Inkson CA, Ono M, Bi Y, Kuznetsov SA, Fisher LW, Young MF. The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. Cells Tissues Organs. 2009;189:153–7.
29. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. Genes Dev. 2010;24:2463–79.
30. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. Haematologica. 2010;95:867–74.
31. Zhao T, Xu Y. p53 and stem cells: new developments and new concerns. Trends Cell Biol. 2010;20:170–5.
32. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. Aging (Albany NY). 2016;8:3–11.
33. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nat Protoc. 2009;4:1798–806.
34. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. Ageing Res Rev. 2016;29:1–12.
35. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood. 2010;115:1549–53.
36. Capelli C, Pedrini O, Cassina G, Spinelli O, Salmoiraghi S, Golay J, et al. Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. Haematologica. 2014;99(6):e94–7.
37. Borgonovo T, Solarewicz MM, Vaz IM, Daga D, Rabelatto CL, Senegaglia AC, et al. Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation. Mol Cytogenet. 2015;8:94.
38. Borghesi A, Avanzini MA, Novara F, Mantelli M, Lenta F, Achille V, et al. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. Cytotherapy. 2013;15:1362–73.
39. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death Dis. 2013;4, e950.
40. Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, Jan M, Totey S, Ta M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2010;19:117–30.
41. Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. Cytotherapy. 2011;13:786–801.
42. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. PloS One. 2014;9, e98565.
43. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay CG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007;25:319–31.
44. Hsieh JY, Fu YS, Chang SJ, Tsuang YH, Wang HW. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. Stem Cells Dev. 2010;19:1895–910.
45. Cavallo C, Cuomo C, Fantini S, Ricci F, Tazzari PL, Lucarelli E, et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. J Cell Biochem. 2011;112:1418–30.
46. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. Blood. 2009; 113:517–25.
47. Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, Newsholme P, Dilley R, Pervaiz S, et al. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells - To Wnt, or not Wnt. Int J Biochem Cell Biol. 2015;68:139–47.
48. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. Trends Endocrinol Metabol. 2009;20:16–24.
49. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. J Mol Endocrinol. 2011;46:65–72.
50. Park JR, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Cell Prolif. 2008;41:859–74.
51. Bakshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, et al. Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. Transfusion. 2008;48:2638–44.
52. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica. 2006;91:1017–26.
53. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13:1477–86.
54. Olofsson TB. Growth regulation of hematopoietic cells. An overview. Acta Oncol. 1991;30:889–902.
55. Rosu-Myles M, Bhatia M. SDF-1 enhances the expansion and maintenance of highly purified human hematopoietic progenitors. Hematol J. 2003;4:137–45.
56. Cain CJ, Manilay JO. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies. Exp Hematol. 2013;41:3–16.
57. Fleming HE, Janzen V, Lo CC, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. Cell Stem Cell. 2008;2:274–83.
58. Hordyjewska A, Popiolek L, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. Cytotechnology. 2015;67:387–96.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit