

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
«Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διαγνωστική και
Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου»

Επιβλέποντα μέλη: Νικόλαος Ανάγνου, Καθηγητής
Ελένη Παπαδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια

**“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΥΡΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ
ΔΙΑ-ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ.”**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΔΗΜΗΤΡΑ ΖΑΓΟΥΡΑ**

2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	4
1.1 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα	6
1.2 Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα	7
1.2.1 Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα	7
1.2.2 Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα	8
1.3 Εύρος διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs).....	9
1.3.1 Ρύθμιση της διαφοροποίησης	11
1.3.2 Δια-διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) .	14
1.4 Πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	15
1.4.1 Μυελός των Οστών.....	15
1.4.2 Ομφαλοπλακουντιακό αίμα	16
1.5 Αμνιακό Υγρό	17
1.5.1 Κυτταρικοί Πληθυσμοί Αμνιακού Υγρού	18
1.5.2 Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα Αμνιακού Υγρού (AF-MSCs)	19
1.6 Εφαρμογή των MSCs στην κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία.....	20
2. Σκοπός της Μελέτης	21
3. Υλικά και Μέθοδοι	23
3.1 Απομόνωση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από αμνιακό υγρό και μελέτη καρυοτύπου.....	24
3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα	24
3.3 Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών.....	25
(BM MSCs).....	25
3.4 Κινητική Αύξησης	25
3.5 Κυτταρομετρία ροής	25
3.6 Απομόνωση RNA	28
3.7 Παραγωγή cDNA	29
3.8 PCR	29
3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) ..	30
3.10 Εντοπισμός του OCT-4 με μέθοδο ανοσοφθορισμού.....	31
3.11 Πρωτόκολλα Διαφοροποίησης AF-MSCs	32
3.11.1 Διαφοροποίηση προς Οστεοβλάστες	32
3.11.2 Διαφοροποίηση προς Λιποκύτταρα	32
3.11.3 Διαφοροποίηση προς Ηπατοκύτταρα	33
3.11.3.1 Πρόσληψη Λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας.....	33
3.11.4 Διαφοροποίηση προς Νευρικά κύτταρα	34
4. Αποτελέσματα.....	34
4.1 Καρυοτυπική Ανάλυση των AF-MSCs	35
4.2 Κινητική Αύξησης των AF-MSCs	35
4.3 Συγκριτική Μελέτη των AF-MSCs, UCB-MSCs και BM-MSCs με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής	36
4.4 Έκφραση γονιδίων εμβρυϊκού χαρακτήρα	41
4.4.1 PCR	41
4.4.2 Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	42
4.4.3 Εντοπισμός της πυρηνικής πρωτεΐνης Oct-4 με μέθοδο ανοσοφθορισμού	43
4.5 Διαφοροποίηση των AF-MSCs.....	44
4.5.1 Διαφοροποίηση προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς.....	44
4.5.2 Διαφοροποίηση προς ηπατοκύτταρα (ενδοδερμική σειρά)	45

4.5.3 Διαφοροποίηση προς νευρικά κύτταρα (εξωδερμική σειρά).....	46
4.6 Δια-διαφοροποίηση των AF-MSCs	47
5. Συζήτηση.....	50
6. Βιβλιογραφία:	53

1. Εισαγωγή

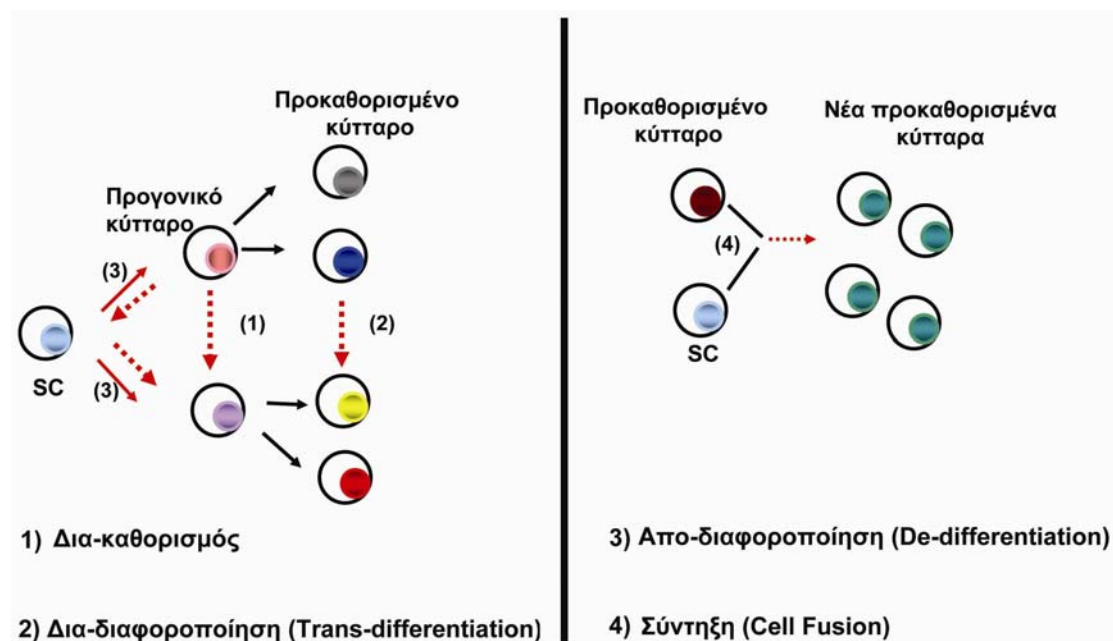
Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών αναπτυξιακές μελέτες έχουν συμβάλλει στην κατανόηση της βιολογίας των προγονικών κυττάρων. Αυτά συνιστώνται από τα βλαστικά κύτταρα (stem cells, SC), που αποτελούν ένα ραγδέως αναπτυσσόμενο πεδίο της σύγχρονης βιολογίας, δοθέντος ότι μπορούν να συντελέσουν αποτελεσματικά στην τεχνολογία αναγέννησης των ιστών.

Τα SC αποτελούν μία κατηγορία κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα α) αυτό-ανανέωσης για απεριόριστο χρονικό διάστημα, χωρίς την εμφάνιση γήρανσης και β) διαφοροποίησης σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων. Επιπλέον, μετά την εμβρυϊκή ζωή τα βλαστικά κύτταρα έχουν επιπρόσθετες λειτουργίες, όπως να αναπληρώνουν συνεχώς πληθυσμούς ώριμων κυττάρων, όπως είναι τα αιμοποιητικά ή τα κύτταρα του δέρματος ή να αντικαθιστούν διαφοροποιημένα κύτταρα σε περίπτωση βλάβης του ιστού.

Κατά τη διάρκεια της οντογενετικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων εμφανίζονται τρεις διαφορετικοί υποπληθυσμοί. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που προκύπτουν μετά τη διαίρεση του ζυγωτού χαρακτηρίζονται ως παντοδύναμα (totipotent) και είναι ικανά να δώσουν γένεση σε ολόκληρο το έμβρυο και την τροφοβλάστη. Καθώς το ζυγωτό αναπτύσσεται, σχηματίζεται η έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) της βλαστοκύστης από την οποία προέρχονται οι ιστοί του εμβρύου. Τα κύτταρα της ICM που ονομάζονται και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα ή πλειοδύναμα (pluripotent) και μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς τα τρία βλαστικά δέρματα, όχι όμως προς ολόκληρο το έμβρυο. Μετά τη γέννηση, οι περισσότεροι ιστοί του ενηλίκου σταδίου περιέχουν πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα, που θα δώσουν γένεση σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Η διαφοροποίηση των κυττάρων είναι περιορισμένου εύρους και ανάλογη του ιστού στον οποίο απαντούν [1].

Τα βλαστοκύτταρα (SC), οι προβαθμίδες όλων των ιστών του σώματος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε σε εμβρυϊκού (embryonic stem cells, ESCs) είτε σε ενηλίκου σταδίου (adult stem cells, ASCs). Στη συνέχεια οι 2 αυτές ομάδες υποδιαίρονται σε υποομάδες, ανάλογα με τον οργανισμό ή τον ιστό από τον οποίο προέρχονται καθώς και ανάλογα με τον ιστό προς τον οποίο μπορούν να διαφοροποιηθούν [1].

Τέλος, τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα, δηλαδή ένα βλαστικό κύτταρο από ένα συγκεκριμένο ιστό ή όργανο έχει την ικανότητα να αποκτήσει το φαινότυπο ενός κυττάρου διαφορετικού ιστού ή οργάνου και σε κάποιες περιπτώσεις να μεταπίπτει ανάμεσα στις μεσοδερμικές, εκτοδερμικές και ενδοδερμικές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν τέσσερις εναλλακτικοί τρόποι μετάπτωσης ενός βλαστικού κυττάρου σε κάποια άλλη κυτταρική σειρά. Ο πρώτος περιλαμβάνει το α) δια-καθορισμό, όπου ένα βλαστοκύτταρο που είναι προγραμματισμένο να δώσει γένεση σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές μεταπίπτει σε άλλο βλαστοκύτταρο και διαφοροποιείται σε κυτταρικούς τύπους του νέου προγόνου. Ο δεύτερος χαρακτηρίζεται ως β) δια-διαφοροποίηση, όπου ένα διαφοροποιημένο κύτταρο αποκτά το φαινότυπο ενός άλλου διαφοροποιημένου κυττάρου. Η τρίτη εναλλακτική διαδικασία είναι η γ) από-διαφοροποίηση, όπου ένα προγονικό κύτταρο διαφοροποιείται σε μία άλλη κυτταρική σειρά. Τέλος, η τέταρτη διαδικασία περιλαμβάνει την κυτταρική σύντηξη [2] (Εικόνα 1).



(Martin-Rendon E & Watt SM., 2003)

Εικόνα 1: Μονοπάτια κυτταρικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων: 1) δια-καθορισμός, 2) δια-διαφοροποίηση, 3) από-διαφοροποίηση, 4) κυτταρική σύντηξη.

1.1 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα και έχουν τη δυνατότητα να δίδουν γένεση και στα τρία βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) καθώς και στα γαμετικά κύτταρα, δηλαδή στα κύτταρα των γονάδων που είναι εξειδικευμένα για την παραγωγή απλοειδών γαμετών.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, η οποία σχηματίζεται 4-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Πιο συγκεκριμένα η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) αρχίζει και ξεχωρίζει από τα κύτταρα της εξωτερικής στιβάδας, τα οποία θα εξελιχθούν σε τροφοεξώδερμα. Τη δεδομένη χρονική στιγμή, το ανθρώπινο έμβρυο, αποτελείται από 200-250 κύτταρα από τα οποία τα περισσότερα συνιστούν το τροφοεξώδερμα ενώ η ICM αποτελείται από 30-34 κύτταρα. Η ICM είναι η πηγή προέλευσης των ESCs και η όλη διαδικασία αντικατοπτρίζει την πρώτη εμφανή διαφοροποίηση στο έμβρυο [3].

Παρά τη δυνατότητα διαφοροποίησης των hESCs σε κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων ακόμη δεν έχει αποδειχθεί *in vivo* κατά πόσον τα hESCs μπορούν να εισαχθούν σε ανθρώπινη βλαστοκύστη και να σχηματίσουν οργανισμό που προέρχεται από τα κύτταρα δύο ανεξάρτητων γενετικών σειρών, όπως επίσης, και εάν έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν βλαστικά γαμετικά κύτταρα σε αναπτυσσόμενο οργανισμό [4].

Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον σχετικά με τη διερεύνηση της δυνατότητας των hESCs να αντικαταστήσουν κατεστραμμένα ή νοσούντα κύτταρα ή ιστούς. Η δυνατότητα της χρήσης των hESCs για τη δημιουργία κυτταρικών πληθυσμών, ιστών ή οργάνων για μεταμοσχεύσεις με πλήρη συμβατότητα με τους ιστούς του ασθενούς, αποτελεί μία επανάσταση στη συμβατική Ιατρική και διαμορφώνει το νέο πεδίο της Αναγεννητικής Ιατρικής. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης και για μελέτες *in vitro* όχι μόνο για τη διερεύνηση των μηχανισμών διαφοροποίησής τους αλλά και για την έρευνα της ανάπτυξης νέων θεραπευτικών φαρμάκων με βάση την αναγνώριση υποψήφιων γονιδίων ως πιθανών θεραπευτικών στόχων, χρησιμοποιώντας τις νέες τεχνολογίες της λειτουργικής γονιδιωματικής, όπως είναι οι DNA μικροδιατάξεις (DNA microarrays) και η πρωτεομική (proteomics) [5].

1.2 Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα

Πέραν των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, έχουν απομονωθεί SCs και από πολλούς εξειδικευμένους ιστούς ενήλικου σταδίου, όπως ο μυελός των οστών, το περιφερικό αίμα, ο κερατοειδής και ο αμφιβληστροειδής, ο εγκέφαλος [6, 7], οι σκελετικοί μύες, ο πολφός των δοντιών, το ήπαρ, το δέρμα, το πάγκρεας και το επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος [8]. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται ενήλικα βλαστικά κύτταρα (adult stem cells, ASCs) εφόσον βρίσκονται μέσα σε διαφοροποιημένους ιστούς ενηλίκων, και σε αντίθεση με τα ESCs δεν χαρακτηρίζονται από ολοδυναμικότητα (totipotency), αλλά από πολυδυναμικότητα (multipotency), δηλαδή τα ASCs δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Εντούτοις τα ASCs μπορούν να πολλαπλασιάζονται μέσα στο ανθρώπινο σώμα χωρίς να διαφοροποιούνται για μακρά χρονικά διαστήματα (long term self renewal) και είναι δυνατόν να δώσουν γένεση σε ώριμα κύτταρα με χαρακτηριστικά και εξειδικευμένες λειτουργίες κυττάρων συγκεκριμένων ιστών [5].

Τα ASCs είναι σχετικά σπάνια και για αυτό το λόγο είναι δύσκολο να αναγνωριστούν και να απομονωθούν. Ένα άλλο βασικό πρόβλημα των ASCs είναι ότι όταν αναπτύσσονται *in vitro*, δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [9].

Η κύρια πηγή προέλευσης των ASCs είναι ο μυελός των οστών. Αυτά τα ASCs υποδιαιρούνται σε δύο υποομάδες, τα αιμοποιητικά SCs τα οποία δίδουν γένεση στα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος και τα στρωματικά ή μεσεγχυματικά SCs (mesenchymal stem cells, MSCs) από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, τα κύτταρα του οστίτη ιστού, των μυών, ενώ συγχρόνως παρέχουν στρωματική υποστήριξη για τα αιμοποιητικά SCs [10].

1.2.1 Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) έχουν χαρακτηριστεί φαινοτυπικά και μπορούν να διαιρεθούν σε διακριτούς πληθυσμούς με βάση το φαινότυπο και τη λειτουργία τους. Ο ένας εκ των δύο είναι τα μακράς διάρκειας (Long Term HSCs,

LT-HSCs) που έχουν τη μέγιστη ικανότητα αυτοανανέωσης και δίνουν γένεση σε όλες τις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές. Οι άμεσοι απόγονοι των LT-HSCs είναι τα βραχείας διάρκειας (Short Term HSCs, ST-HSCs), τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση στις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, αλλά μόνο για περιορισμένη χρονική περίοδο, [4, 11] και αποτελούν το δεύτερο υποπληθυσμό.

Τα HSCs θεωρούνται ότι εμφανίζουν πλαστικότητα (plasticity) για τουλάχιστον τρεις λόγους. Πρώτον, μπορούν να εξισορροπήσουν τις διαδικασίες αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης. Δεύτερον, έχουν τη δυνατότητα να δίνουν γένεση σε τουλάχιστον 10 διαφορετικές κατηγορίες ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων σε επαρκείς ποσότητες καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Αυτό καθορίζεται σύμφωνα με τις απαιτήσεις του οργανισμού για τη διατήρηση της φυσιολογικής του κατάστασης. Τέλος, τα HSCs εμφανίζουν πλαστικότητα ελέγχοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό τους και διατηρώντας τη σταθερότητά τους. Για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως αργά πολλαπλασιαζόμενα (slow cycling) [2, 7].

Τα HSCs είναι σπάνια και απαντούν σε συχνότητα 1 στα 10^4 - 10^5 των συνολικών αιμοποιητικών κυττάρων. Εντούτοις έχει επιτευχθεί η απομόνωσή τους βάσει της έκφρασης συγκεκριμένων μορίων επιφανείας των κυττάρων [2]. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα που εκφράζουν το μόριο CD34 είναι ικανά για αποκατάσταση της αιμοποίησης σε ανοσο-ανεπαρκή ποντίκια [12] και στα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα η απομόνωση των HSCs επιτυγχάνεται με τη χρήση CD34⁺ πληθυσμών. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία HSCs έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών, ομφαλοπλακουντιακό αίμα και περιφερικό αίμα.

Τα HSCs έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόσχευμα σε μη κακοήθη νοσήματα, όπως η απλαστική αναιμία, η β-θαλασσαιμία, η λευκοδυστροφία σφαιροειδών κυττάρων, οι συγγενείς ανωμαλίες μεταβολισμού, τα αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και σε κακοήθη νοσήματα, όπως το λέμφωμα, η λευχαιμία και το μυέλωμα [5, 9]. Επιπλέον, τα HSCs αποτελούν ιδανικό στόχο για την τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας, με τη μεταφορά γονιδίων μέσω μεταγωγής από ιογενείς φορείς, όπως οι ρετροϊοί και οι λεντιοί [13].

1.2.2 Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), που ανήκουν στο στρωματικό περιβάλλον του μυελού των οστών ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τις μελέτες

των Friedenstein και Petrakova (1966), που απομόνωσαν προγόνους οστεοκυττάρων από μυελό αρουραίου. Ο όρος μεσεγγυμα, υποδηλώνει τον αναπτυσσόμενο χαλαρό συνδετικό ιστό του εμβρύου, προερχόμενο κυρίως από το μεσόδερμα, το οποίο έχει την ικανότητα να δίδει γένεση σε ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων του συνδετικού ιστού του ενηλίκου [14].

Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα (0.001-0.01% του συνολικού πληθυσμού) των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών. Εντούτοις, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό επιφανειακών δεικτών των MSCs για την αποτελεσματικότερη απομόνωσή τους και έχει διαπιστωθεί ότι είναι δυνατόν να απομονωθούν και να εκπτυχθούν ικανοποιητικά και ακολούθως να διαφοροποιηθούν με τις κατάλληλες επαγωγικές ουσίες προς διάφορες κυτταρικές σειρές [14]. Πιο συγκεκριμένα έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του εμβρυϊκού μεσοδέρματος, όπως είναι οι οστεοβλάστες, τα χονδροκύτταρα, τα λιποκύτταρα, καθώς και σε κύτταρα του εκτοδέρματος, όπως τα νευρικά κύτταρα. Επιπλέον, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των MSCs είναι η ικανότητα αυτο-ανανέωσης, δηλαδή έχουν τη δυνατότητα να δίνουν πανομοιότυπα αντίγραφα των ιδίων μετά από μιτωτικές διαιρέσεις για ευρύ χρονικό διάστημα (ακόμα και κατά τη διάρκεια ολόκληρης της ζωής του οργανισμού).

Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών τους, καθώς και της δυνατότητάς τους για *in vivo* αποκατάσταση του ιστού, στον οποίο δίδουν γένεση αποτελούν ένα ελκυστικό εργαλείο στο πλαίσιο της εμβιομηχανικής των ιστών και της κυτταρικής θεραπείας γενικότερα. Επιπροσθέτως, είναι αξιοσημείωτο ότι ούτε αυτόλογο ούτε αλλογενικό μόσχευμα MSCs προκαλεί ανοσοαντίδραση στον ξενιστή μετά από τοπική μεταμόσχευση [15].

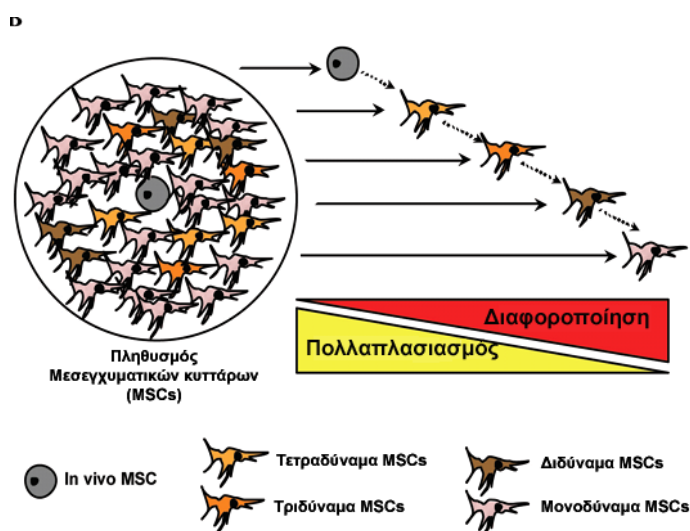
1.3 Εύρος διαφοροποίησης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs)

Η δυνατότητα διαφοροποίησης των MSCs πληθυσμών σε μία ποικιλία κυτταρικών σειρών προερχόμενα από διαφορετικά είδη έχει αναλυτικά μελετηθεί *in vitro* ήδη από την πρώτη ανακάλυψη το 1960 [16]. Αυτές οι μελέτες απέδειξαν ότι πληθυσμοί MSCs από μυελό των οστών προερχόμενοι από άνθρωπο, κουνέλι, αρουραίο και ποντίκι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν διαφοροποιημένους μεσεγγυματικούς φαινοτύπους *in vitro* και *in vivo*, συμπεριλαμβάνοντας τα οστά, το

χόνδρο, τον τένοντα, τους μύες, το λιπώδη ιστό και το αιμοποιητικό στηρικτικό στρώμα. Η ικανότητα των MSCs να διαφοροποιούνται σε μία ποικιλία συνδετικών ιστών τα καθιστά ως ιδανική υποψήφια κυτταρική πηγή για στρατηγικές κλινικής μεταμόσχευσης ιστών, καθώς και για επαύξηση και τοπική επιδιόρθωση και αναγέννηση του οστού, του χόνδρου και του τένοντα [17-19].

Ανεξάρτητες αποικίες προερχόμενες από μεμονωμένους MSC προγόνους έχουν χαρακτηριστεί ως ετερογενείς όσον αφορά το δυναμικό διαφοροποίησής τους. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι μόνο το 1/3 των αρχικώς προσκολλημένων κλώνων από BM-MSCs είναι πολυδύναμοι (προς οστεο-, λιπο-, χόνδρο-κύτταρα) [20]. Επιπλέον, μη-αθανατοποιημένοι κυτταρικοί κλώνοι μελετήθηκαν και αποδείχθηκε ότι το 30% των *in vitro* BM-MSCs προερχόμενων κλώνων επιδεικνύουν δυνατότητα διαφοροποίησης προς τις τρεις κυτταρικές σειρές (οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα) [21]. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι οι MSC κλώνοι εμφανίζουν ετερογένεια ως προς το δυναμικό ανάπτυξής τους.

Η ετερογένεια των MSCs έχει αποδειχθεί μετά από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, που αποδεικνύουν ότι η δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι πηγές των MSCs δεν συνιστώνται μόνο από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, αλλά και από υποπληθυσμούς σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης (Εικόνα 2).



(Baksh et al, 2004)

Εικόνα 2: Τα MSCs *in vivo* συνιστούν έναν κυτταρικό πληθυσμό που αποτελείται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, που έχουν διαφορετικά δυναμικά διαφοροποίησης. Κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης το δυναμικό πολλαπλασιασμού και η πολυδυναμία αυτών των διαφορετικών μεσεγχυματικών σειρών μειώνεται.

Σε αυτό το μοντέλο, τα BM-MSCs συνιστούν έναν πρωταρχικό πληθυσμό βλαστικών κυττάρων (πολυδύναμων MSCs), ανάλογο των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και έχουν τη δυνατότητα εκτεταμένης αυτο-ανανέωσης και σχηματισμού όλων των προερχόμενων από το μεσόδεσμα ιστών, ενώ συνυπάρχουν και MSCs με διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης προς μία, δύο, τρεις ή τέσσερις κατευθύνσεις (μονο-, δι-, τρι-, τετρα-, MSCs). Αυτά τα πολυδύναμα MSCs έχουν περιορισμένη δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και δίνουν γένεση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους με τελικό διαφοροποιημένο φαινότυπο [15].

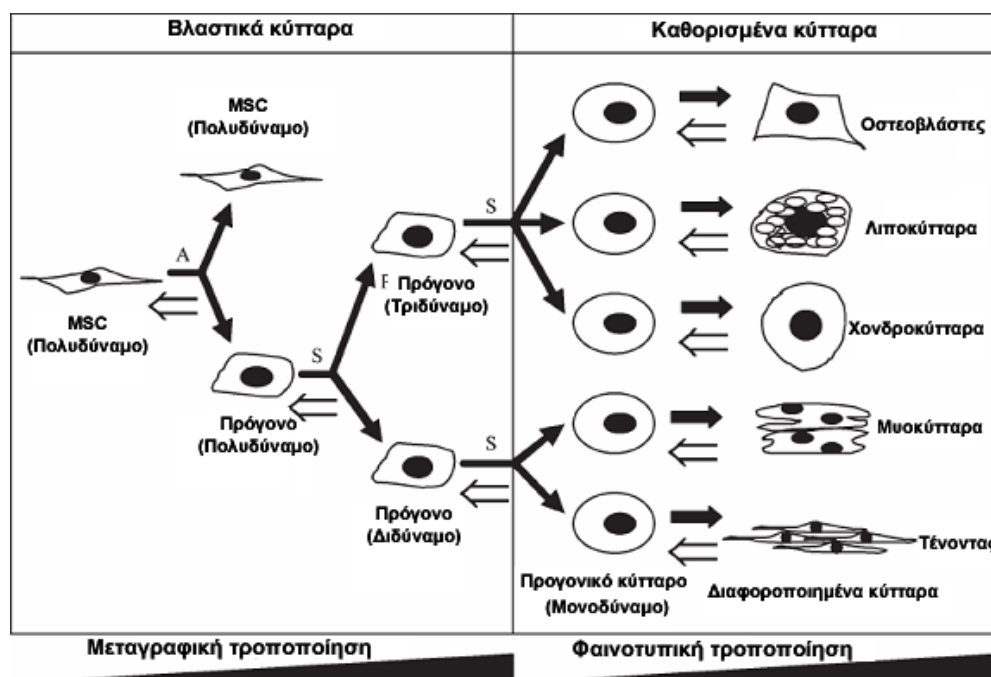
Αρκετές στρατηγικές έχουν προταθεί για την καλλιέργεια και απομόνωση των MSCs, όπως καλλιέργεια των κυττάρων με συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες και εμπλουτισμός κυττάρων κατά το πρωταρχικό στάδιο καλλιέργειας. Εντούτοις, η γενική προσέγγιση στην καλλιέργεια των MSCs περιλαμβάνει απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων που περιέχουν MSCs από μονάδες μυελού των οστών, ομφαλοπλακουντιακού αίματος και αμνιακού υγρού και ανάπτυξη αυτών των κυττάρων σε κατάλληλες καλλιεργητικές πλάκες με θρεπτικό μέσο, που περιλαμβάνει ορό. Εντός 24-48 ωρών, τα μη-προσκολλημένα αιμοποιητικά κύτταρα απομακρύνονται και τα προσκολλημένα κύτταρα καλλιεργούνται και εκπτύσσονται. Επιπλέον, συγκεκριμένοι αυξητικοί παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν στον επιλεκτικό εμπλουτισμό των διαφοροποιημένων MSCs μονάδων [9, 22, 23].

1.3.1 Ρύθμιση της διαφοροποίησης

Με βάση γενετική και γενομική πληροφορία από διάφορες μελέτες έχει προταθεί ένα μοντέλο για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, που περιλαμβάνει δύο διακριτά στοιχεία.

Αρχικά, τα MSCs ύστερα από μεταγραφική τροποποίηση δίδουν γένεση σε προγονικά κύτταρα, χωρίς φαινοτυπικές διαφορές που συνεχίζουν να διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης. Η πλειοψηφία των MSCs που καλλιεργούνται *in vitro* παραμένουν ανενεργά και στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου, μέχρι να ενεργοποιηθούν μετά την επίδραση αυξητικών παραγόντων. Μετά τη διέγερσή τους, τα πολυδύναμα, μη διαφοροποιημένα MSCs υφίστανται ασύμμετρη διαίρεση, που οδηγεί στη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων, εκ των οποίων το πρώτο είναι ακριβές αντίγραφο του μητρικού κυττάρου και διατηρεί το πολυδυναμία του και το

δεύτερο θυγατρικό κύτταρο εξελίσσεται σε προγονικό κύτταρο με ένα πιο περιορισμένο αναπτυξιακό πρόγραμμα. Σε αυτό το μοντέλο, το προγονικό κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται ασύμμετρα, δημιουργώντας προβαθμίδες με δυνατότητα διαφοροποίησης προς δύο ή τρεις κυτταρικές σειρές. Αυτά τα προγονικά κύτταρα είναι μορφολογικά παρόμοια με τα πολυδύναμα MSCs, αλλά διαφέρουν στο εύρος της γονιδιακής μεταγραφής. Η εξέλιξη των MSCs σε προγονικά κύτταρα συμβαίνει όταν οι προβαθμίδες συνεχίζουν να διαιρούνται συμμετρικά και να δίνουν γένεση σε προγόνους διακριτών κυτταρικών σειρών, που θα εξελιχθούν σε ώριμα κύτταρα με συγκεκριμένο φαινότυπο (Εικόνα 3).



(Baksh et al, 2004)

Εικόνα 3: Τα MSCs βρίσκονται σε 2 στάδια, των βλαστικών κυττάρων και των καθορισμένων κυττάρων, που έχουν την τάση να αποκτήσουν συγκεκριμένο φαινότυπο. Στο πρώτο στάδιο τα πολυδύναμα MSCs μέσω ασύμμετρης διαίρεσης δίδουν γένεση σε κύτταρα με μειωμένη πολυδυναμικότητα, τα οποία μέσω συμμετρικής διαίρεσης οδηγούν στη δημιουργία προγονικών κυττάρων με μειωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. Αντίθετα, ο προκαθορισμένος κυτταρικός πληθυσμός συνεχίζει μέσω συμμετρικής διαίρεσης να δίνει γένεση σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα.

Ανάλυση της *in vitro* διαφοροποίησης των MSCs υπό κατάλληλες συνθήκες έχει οδηγήσει στην αναγνώριση αρκετών παραγόντων απαραίτητων για τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Ανάμεσα σε αυτούς, περιλαμβάνονται εκκρινόμενα μόρια και οι υποδοχείς τους.

Η μετάβαση από τα βλαστικά κύτταρα στα προγονικά κύτταρα και στη συνέχεια στα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα για να γίνει πλήρως κατανοητή πρέπει να απαντηθούν ερωτήματα, που περιλαμβάνουν τους μηχανισμούς που επιτρέπουν αυτή τη μετάβαση, όπως ρυθμιστικά βιοχημικά μονοπάτια που επιτρέπουν ή όχι την εξέλιξη της διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων, πώς τα προγονικά κύτταρα επιλεκτικά διαφοροποιούνται προς μία συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και εάν τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα διατηρούν την πολυδυναμία τους.

Ο καθορισμός και η διαφοροποίηση των MSCs σε συγκεκριμένους ώριμους κυτταρικούς τύπους είναι μία ρυθμιστική διαδικασία, που περιλαμβάνει ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και μορίων της θεμέλιας κυτταρικής ουσίας. Η τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών μπορεί να συμβάλλει στον προσδιορισμό των γονιδίων που συμμετέχουν στον καθορισμό και στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Έως τώρα αυτή η προσέγγιση έχει πραγματοποιηθεί για τα γονίδια που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των MSCs προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα [24, 25].

Επιπλέον, ανάλυση της *in vitro* διαφοροποίησης των MSCs υπό κατάλληλες συνθήκες έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση ποικίλων παραγόντων απαραίτητων για τον καθορισμό των βλαστικών κυττάρων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται εκκρινόμενα μόρια, όπως ο TGF- β , μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, κυτταροσκελετός της ακτίνης και ενδοκυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως Cbfa1/Runx2, PPAR γ , Sox9 και MEF2 που έχουν σημαντικό ρόλο στην κατεύθυνση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς συγκεκριμένες σειρές και στην ανάκτηση διαφοροποιημένων φαινοτύπων [26, 27].

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι μέλη της οικογένειας Wnt συντελούν στη διαφοροποίηση των MSCs προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές [28, 29]. Η Wnts οικογένεια συνίσταται από εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, που έχει αναφερθεί ότι συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανάκτησης του φαινοτύπου των βλαστοκυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt αυξάνει τη σταθερότητα της κυτταροπλασματικής β -κατενίνης, μέσω απενεργοποίησης της ενεργότητας της GSK-3 κινάσης και προώθησης της μετανάστευσης της β -κατενίνης στον πυρήνα. Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο σύμπλοκο β -κατενίνη/TCF/LEF

ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που περιλαμβάνονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση [30].

1.3.2 Δια-διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs)

Ο όρος δια-διαφοροποίηση αναφέρεται στη φαινοτυπική αλλαγή από ένα διαφοροποιημένο τύπο κυττάρου σε έναν άλλο. Έχει εκτενώς μελετηθεί ως μία φυσιολογική διαδικασία στα είδη των αμφιβίων, όπως κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των άκρων και κατά τη μετάβαση του μελαχρουν επιθηλίου σε φακό και νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Η δια-διαφοροποίηση επίσης μπορεί να συμβαίνει σε θηλαστικά συστήματα, όπως ενήλικα βλαστικά κύτταρα σπονδυλόζων που έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους, στους οποίους δεν ανήκουν φυσιολογικά [31].

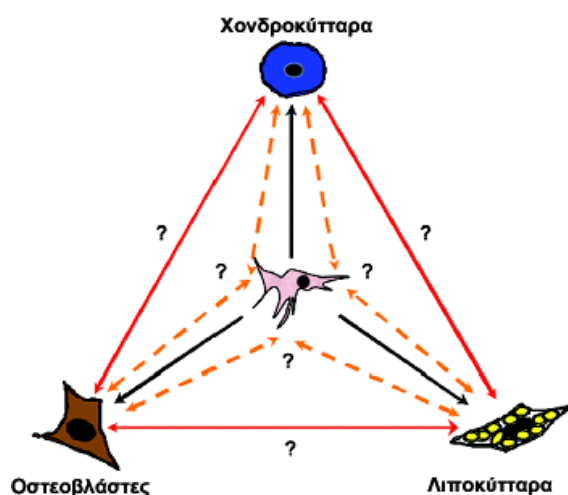
Αναφορικά με τα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), μελέτες *in vivo* μεταμόσχευσης έχουν αποδείξει ότι τα MSCs μπορούν να αναπληρώσουν ολόκληρο το σύστημα του μυελού των οστών σε ακτινοβολημένα ποντίκια και να δώσουν γένεση όχι μόνο σε κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, αλλά και σε κύτταρα με χαρακτηριστικά νευρώνων [32]. Αυτός ο τύπος διαφοροποίησης, που χαρακτηρίζεται ως δια-διαφοροποίηση υποδηλώνει ότι τα MSCs διατηρούν την πολυδυναμία τους, ακόμα και εάν έχουν εκτεθεί πρωτύτερα σε συγκεκριμένους επαγωγικούς παράγοντες. Εντούτοις, αυτή η ικανότητα δια-διαφοροποίησης των ενήλικων MSCs έχει αμφισβητηθεί, λόγω της πιθανής επιμόλυνσης ή σύντηξης των MSCs με προγονικά βλαστικά κύτταρα στον ιστό-στόχο [33]. Επιπλέον, δεν μπορεί να θεωρηθεί βέβαιο ότι τα προκαθορισμένα προγονικά κύτταρα διαθέτουν δυναμικό δια-διαφοροποίησης σε βαθμό αντίστοιχο των βλαστικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν αποδείξει ότι το φαινόμενο της δια-διαφοροποίησης είναι αποτέλεσμα διαφοροποιημένων κυττάρων και όχι κυτταρικής σύντηξης [34].

Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν κύτταρα διαφορετικά από αυτά των υπαρχόντων ιστών κατά τη διάρκεια *in vivo* μεταμόσχευσης [9]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πειράματα *in vitro* διαφοροποίησης που απέδειξαν ότι οι πλήρως διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες, καθώς και τα πλήρως διαφοροποιημένα λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα

προερχόμενα από MSCs μπορούν να μεταβούν σε άλλους κυτταρικούς τύπους της μεσεγχυματικής σειράς, κατόπιν κατάλληλης κυτταρικής διέγερσης [34] (Εικόνα 4).

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της δια-διαφοροποίησης παρατηρείται εκτεταμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τα προκαθορισμένα κύτταρα χάνουν τον ειδικό φαινότυπό τους. Στη συνέχεια μπορούν να μεταβούν σε μία κατάσταση αντίστοιχη των προγονικών κυττάρων, δηλαδή να υποστούν αποδιαφοροποίηση και να αποκτήσουν μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά όμοια με των προγονικών βλαστικών κυττάρων. Κατόπιν, με κατάλληλους επαγωγικούς παράγοντες τα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αποκτήσουν ένα νέο διαφοροποιημένο φαινότυπο [15].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα προκαθορισμένα προγονικά κύτταρα, καθώς και τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα διατηρούν την πολυδυναμία και την πλαστικότητα τους. Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να ανακτηθούν υπό κατάλληλες συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως ιστική επιδιόρθωση και αναγέννηση [34].



Εικόνα 4: Τα MSCs χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα να δια-διαφοροποιούνται και να αποδιαφοροποιούνται ανάλογα με τις καλλιεργητικές συνθήκες. Κατά αυτό τον τρόπο έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα και επίσης να δια-διαφοροποιούνται απευθείας σε άλλους συνδετικούς ιστούς. Επιπλέον, τα διαφοροποιημένα MSCs έχουν τη δυνατότητα να επανέρχονται σε κύτταρα με χαρακτηριστικά των αδιαφοροποίητων MSCs, μέσω γενωμικού προγραμματισμού.

(Baksh et al,2004)

1.4 Πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

1.4.1 Μυελός των Οστών

Ως κύρια πηγή μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων θεωρείται ο μυελός των οστών, ο οποίος αποτελεί έναν πολύπλοκο ιστό που περιλαμβάνει προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και προβαθμίδες των μη αιμοποιητικών ιστών [35]. Οι πρόγονοι των μη αιμοποιητικών ιστών έχουν τη δυνατότητα να υποστηρίζουν την

ανάπτυξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, την αυτοανανέωσή τους χωρίς διαφοροποίηση και χαρακτηρίζονται ως στρωματικά κύτταρα του μυελού ή μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs). Τα MSCs συνιστούν ένα σπάνιο πληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων με δυνατότητα διαφοροποίησης σε τρεις (οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα) ή και περισσότερες σειρές (μυοκύτταρα) [36]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs από μυελό των οστών μπορούν να υφίστανται επεξεργασία *ex vivo*, γεγονός που τα καθιστά ως σημαντικό «εργαλείο» στο πλαίσιο της εμβιομηχανικής των ιστών και της κυτταρικής θεραπείας γενικότερα [20].

Εντούτοις ένα μείζον πρόβλημα του ιστού αυτού είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των MSC μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας, έχουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης και βραχύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Ένα άλλο μειονέκτημα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών είναι ότι όταν αναπτύσσονται *in vitro* δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [37]. Επιπλέον, η διαδικασία είναι αρκετά επίπονη για το δότη, γεγονός το οποίο καθιστά επιτακτική την ανάγκη της αναζήτησης επαρκών εναλλακτικών πηγών των κυττάρων αυτών για αυτόλογη ή ετερόλογη θεραπευτική χρήση.

Σύμφωνα με τα σημερινά δεδομένα ο μυελός των οστών αποτελεί την κύρια πηγή MSCs [38]. Όμως MSCs έχουν απομονωθεί και από άλλους ενήλικους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού [39], του δέρματος [40], του μυός [41], του συνδετικού ιστού και του πλακούντα [42]. MSCs έχουν απομονωθεί σε μικρό ποσοστό από περιφερικό [43] και ομφαλοπλακουντιακό αίμα [44, 45], καθώς και από το έλυτρο του Wharton (Wharton's jelly) στον ομφάλιο λώρο [46]. Έχουν τέλος απομονωθεί και από εμβρυϊκούς ιστούς όπως, ο εμβρυϊκός μυελός των οστών και το αμνιακό υγρό [47].

1.4.2 Ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Μία εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων, έναντι του μυελού των οστών, αποτελεί το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (umbilical cord blood, UCB). Το μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου ετήσιου αριθμού γεννήσεων επιβεβαιώνει ότι το

ομφαλοπλακουντιακό αίμα μπορεί να αποτελέσει μία από τις μεγαλύτερες πηγές βλαστικών κυττάρων, λόγω των πλεονεκτημάτων της προγονικής τους ανοσολογικής κατάστασης και του σχετικά αυξημένου μήκους των τελομερών. Επιπλέον, το γεγονός ότι δεν υπάρχουν ηθικοί φραγμοί το καθιστά ως μία αποτελεσματική πηγή βλαστικών κυττάρων στην κυτταρική θεραπεία [48].

Πιο συγκεκριμένα, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα έχει αποτελέσει μία άριστη πηγή αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης, δοθέντος ότι προκλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία υψηλού ποσοστού $CD34^+CD38^-$ κυττάρων στο UCB [49], αποδεικνύοντας την παρουσία προγονικών κυττάρων που είναι άφθονα στο αίμα του νεογνού.

Επιπλέον, έχουν πρόσφατα απομονωθεί και ομογενείς κυτταρικοί πληθυσμοί μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα σε ποσοστό 60% [50]. Ο εκτενής χαρακτηρισμός αυτών των κυττάρων έχει αποδείξει ότι είναι παρόμοια με τα BM-MSCs, όσον αφορά τις κυτταρικές ιδιότητες και το δυναμικό διαφοροποίησής τους [51]. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι τα UCB-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, όπως οστεοβλάστες, λιποκύτταρα [52], νευρικά κύτταρα [53] και καρδιομυοκύτταρα [54]. Η συχνότητα των MSCs προερχόμενα από UCB είναι αρκετά χαμηλή συγκρινόμενη με αυτών που προέρχονται από BM. Εντούτοις, η κλωνογονική τους ικανότητα επιτρέπει τη δημιουργία κυττάρων με αυξημένο προγονικό χαρακτήρα σε σχέση με κύτταρα από το μυελό των οστών [55]. Επιπλέον, επειδή τα UCB-MSCs είναι λιγότερο ώριμα από τα BM-MSCs έχουν λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσουν ανοσολογικές αντιδράσεις σε διαδικασίες μεταμόσχευσης [56].

Εντούτοις, στα μειονεκτήματα των UCB-MSCs πρέπει να συμπεριληφθούν οι δύσκολες συνθήκες απομόνωσης και έκπτυξής τους, καθώς και το μικρό ποσοστό τους στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Αυτό το γεγονός προβάλλει έντονη την ανάγκη για την εύρεση εναλλακτικών πηγών MSCs, που θα έχουν βελτιωμένες ιδιότητες και θα επιτρέψουν την αποτελεσματική τους χρήση στην κυτταρική θεραπεία [57].

1.5 Αμνιακό Υγρό

Το ανθρώπινο αμνιακό υγρό (amniotic fluid, AF) χρησιμοποιείται στην προγεννητική διάγνωση τα τελευταία 70 χρόνια. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλές, αξιόπιστο και

αποτελεσματικό εργαλείο για την πρόβλεψη πολλών γενετικών και αναπτυξιακών ασθενειών. Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις ότι το αμνιακό υγρό μπορεί εκτός από ένα διαγνωστικό εργαλείο να αποτελέσει και πηγή για θεραπεία συγγενών και επίκτητων ασθενειών [58].

Η παραγωγή του AF αρχίζει 4-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, όταν ο ζυγώτης ετοιμάζεται να εμφυτευτεί στο ενδομήτριο. Στην αρχή της εγκυμοσύνης, το AF προέρχεται από εκκρίσεις των κυττάρων του αμνιακού επιθηλίου ή από την υπερδιήθηση του αίματος της μητέρας και το διϊδρωμα, μέσω του μη κερατινοποιημένου δέρματος του εμβρύου ή μέσω του φθαρτού. Καθώς η κύηση εξελίσσεται, η ποσότητα του AF αυξάνεται ενώ αυτό διακινείται και αντικαθίσταται κάθε 3 ώρες. Τις κύριες πηγές παραγωγής του αποτελούν τα ούρα, οι σιελογόνοι αδένες, το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα του εμβρύου. Εντούτοις, το αμνιακό υγρό έχει μελετηθεί ελάχιστα από την άποψη των υποπληθυσμών των κυττάρων που περιέχει [59].

1.5.1 Κυτταρικοί Πληθυσμοί Αμνιακού Υγρού

Το αμνιακό υγρό συνίσταται από ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς με μεγάλο μορφολογικό εύρος. Μελέτες αυτών των κυττάρων έχουν αποδείξει ότι διαφέρουν σε σχήμα και μέγεθος με διάμετρο από 6μm έως 50 μm και σχήμα κυκλικό έως επίμηκες. Το AF ανάλογα με την ηλικία της κύησης, την παθολογία του εμβρύου και άλλους παράγοντες είναι δυνατόν να περιέχει κύτταρα και από τις τρεις γαμετικές στοιβάδες του εμβρύου (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) [38].

Τα περισσότερα κύτταρα του αμνιακού υγρού τελικά διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά κύτταρα και τροφοβλάστες [60]. Τα ανθρώπινα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από τους αμνιοβλάστες την 8^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση σχηματίζουν την έσω στιβάδα του αμνιακού σάκου. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν και στις τρεις γαμετικές στιβάδες και αποτελούν μέρος του κυτταρικού πληθυσμού του αμνιακού υγρού [61].

Τα κύτταρα του AF, βάσει μορφολογικών, βιοχημικών και αναπτυξιακών κριτηρίων έχουν περαιτέρω διαχωρισθεί σε :

1.Επιθηλιοειδή κύτταρα, Ε-τύπου που προέρχονται από το δέρμα και το ουροποιητικό σύστημα του εμβρύου.

2.Κύτταρα αμνιακού υγρού, AF-τύπου που προέρχονται από τις εμβρυϊκές μεμβράνες και την τροφοβλάστη.

3.Ινοβλαστικά κύτταρα, F-τύπου που προέρχονται από τον ινώδη συνδετικό ιστό και τους δερματικούς ινοβλάστες [59].

1.5.2 Μεσεγγυματικά Βλαστικά Κύτταρα Αμνιακού Υγρού (AF-MSCs)

Σύγχρονες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το αμνιακό υγρό περιλαμβάνει μία ποικιλία ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων, που προέρχονται από εμβρυονικούς ιστούς κατά τη διάρκεια της κύησης. Ένα βασικό ερώτημα το οποίο πρέπει να απαντηθεί, είναι κατά πόσο στους υποπληθυσμούς κυττάρων του AF περιλαμβάνονται μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (AF-MSCs) [62].

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι τα AF-MSCs που έχουν απομονωθεί από AF του δεύτερου τριμήνου της κύησης έχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των MSCs προερχόμενων από άλλες πηγές, όπως από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και από πρώτου τριμήνου εμβρυϊκούς ιστούς (αίμα, ήπαρ και μυελός των οστών). Τα AF-MSCs έχουν βρεθεί θετικά για τα SH2, SH3, SH4, CD29, CD44 καθώς και για τα HLA-A, B, C, και αρνητικά για τα CD10, CD11b, CD14, CD34, CD117, EMA και αρνητικά για τα HLA-DR, DP, DQ [20, 63].

Επιπλέον, τα AF-MSCs εκφράζουν το Oct-4, έναν μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται στα εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα, στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και στα εμβρυονικά γαμετικά κύτταρα, αποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο της πολυδυναμίας των ανθρώπινων μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* [64].

Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση της τελομεράσης, ενός άλλου δείκτη ολοδυναμικότητας, σε αμνιακά κύτταρα 14 εβδομάδων, χωρίς εντούτοις στο AF να υπάρχουν καρκινικά ή αθανатоποιημένα κύτταρα, γεγονός το οποίο ενισχύει την υποψία ύπαρξης υποπληθυσμών κυττάρων με ιδιότητες SC [65].

Τέλος, έχει περιγραφεί ότι τα AF-MSCs έχουν υψηλό ποσοστό έκπτυξης και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς τις κυτταρικές σειρές του μεσοδέρματος, δηλαδή προς οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδρκύτταρα. Επιπλέον, η ολοδυναμικότητα, τους δίνει τη δυνατότητα να μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα της μεσοδερμικής και εξωδερμικής σειράς.

Συμπερασματικά, τα AF-MSCs μπορούν να αποτελέσουν έναν ελκυστικό πληθυσμό για πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας, όπως αντιμετώπιση περιστατικών εμφράγματος του μυοκαρδίου, βελτίωση της αγγειογένεσης και επιδιόρθωση οστικού τραύματος [66]. Επιπλέον, τα MSC μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πρωτόκολλα ετερόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η μεταμόσχευση SC αίματος ομφαλίου λώρου (umbilical cord blood, UCB) έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη αποκατάσταση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων σε σχέση με τη μεταμόσχευση κυττάρων που προέρχονται από μυελό των οστών [67]. Μελέτες σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (non-obese diabetic mice with severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) έδειξαν ότι η ταυτόχρονη χορήγηση MSC και SC προερχόμενα από UCB, ενισχύει την έκπτυξη των CD34⁺ αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων [68]. Επομένως, τα AF-MSCs μπορούν να δώσουν λύση στους περιορισμούς των μεταμοσχεύσεων βλαστικών κυττάρων UCB [47].

1.6 Εφαρμογή των MSCs στην κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, ένα από τα κεντρικά πεδία της σύγχρονης βιολογίας αποτελεί η συστηματική μελέτη των βλαστικών κυττάρων, λόγω των σημαντικών γνώσεων οι οποίες αναμένεται ότι θα προκύψουν σχετικά με την προοπτική της δυνατότητας αποτελεσματικής αναγέννησης των ιστών.

Σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών σχετικά με τις μεταμοσχεύσεις ζώων, τα MSCs που εκπύσσονταν *ex vivo* είχαν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ιστού του ξενιστή, να συμβάλλουν στην επιδιόρθωση του ιστού μετά από τραύμα ή ασθένεια και μερικώς να τον επαναφέρουν στην αρχική του λειτουργία. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν συντελούν μόνο στην αναγέννηση ιστών μεσεγχυματικών σειρών, όπως χόνδρος μεσοσπονδύλιου δίσκου, χόνδρος των αρθρώσεων των γονάτων, οστό [69], και καρδιομυοκύτταρα [70] αλλά μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα προερχόμενα από άλλες εμβρυϊκές στιβάδες, όπως νευρώνες [71], επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, ήπαρ, πνεύμονας, έντερο, νεφρό και σπλήνα [72]. Αυτές οι εφαρμογές επιβεβαιώνουν την πλαστικότητα των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων και τη χρησιμότητά τους στην ιστική επιδιόρθωση και αναγέννηση, καθώς και στην κυτταρική θεραπεία.

Επιπροσθέτως, είναι σημαντικό το γεγονός ότι ούτε αυτόλογο ούτε αλλογενές μόσχευμα MSCs προκαλεί οποιαδήποτε ανοσοαντίδραση στον ξενιστή μετά από τοπική μεταμόσχευση ή συστηματική χορήγηση. Επομένως, τα MSCs μπορούν να αποτελέσουν ιδανικό φορέα για μεταφορά γονιδίων σε υποψήφιους ιστούς για εφαρμοσμένη γονιδιακή θεραπεία [73].

Αρκετές προσεγγίσεις έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την εισαγωγή εξωγενούς DNA στα MSCs, ώστε να καταστούν χρήσιμα στις θεραπείες αναγέννησης των ιστών [15]. Η ιϊκή διαμόλυνση, ειδικά με τη μεταφορά γονιδίων μέσω αδενοϊών μπορεί να επιτρέψει τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών κλώνων με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλή κυτταρική θνησιμότητα, γεγονός που τα καθιστά δημοφιλές εργαλείο για κυτταρική θεραπεία. Έχει αναφερθεί ότι MSCs που είχαν διαμολυνθεί με μεταλλαγμένο γονίδιο του κολλαγόνου τύπου I μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για επιδιόρθωση οστού σε ασθενείς με οστική ατέλεια [69].

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το μεγάλο δυναμικό τους, ο αριθμός των MSCs από μυελό των οστών είναι αρκετά χαμηλός ώστε να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για κλινικές εφαρμογές αναγέννησης ιστών. Για αυτό το σκοπό είναι αναγκαία η ανεύρεση κυττάρων με μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα και δυναμικό έκπτυξης.

2. Σκοπός της Μελέτης

Ο κύριος στόχος της ερευνητικής μας ομάδας είναι ο συστηματικός χαρακτηρισμός νέων δυνητικών πηγών για την απομόνωση βλαστικών κυττάρων, χωρίς την παρουσία ηθικών ζητημάτων, που συνοδεύουν την έρευνα στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Μία τέτοια πηγή είναι και το αμνιακό υγρό (AF) [59]. Παρά την εδραιωμένη χρήση του αμνιακού υγρού στην προγεννητική διάγνωση, η υπάρχουσα γνώση σχετικά με τις ιδιότητες των κυττάρων του είναι πολύ περιορισμένη.

Σκοπός της μελέτης είναι η απομόνωση και ο φαινοτυπικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των MSCs του αμνιακού υγρού, πριν την ενδεχόμενη αξιοποίησή τους σε κλινικές δοκιμές. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συνδυασμοί πρωτοκόλλων βιολογίας των βλαστικών κυττάρων, ανοσοκυτταροχημείας, κυτταρομετρίας ροής, αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) και απομόνωσης κλώνων των κυττάρων αυτών.

Τα πρώτα αποτελέσματα έχουν δείξει πως τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν μορφολογία ινοβλαστών σε *in vitro* καλλιέργειες και χαρακτηρίζονται φαινοτυπικά από την παρουσία των δεικτών CD90 (Thy-1), CD105 (ενδογλίνη), CD73 (SH3, SH4), CD29 (β₁-ιντεγκρίνη), CD49e (VLA-5), CD44 (HCAM-1) και CD166 (SB10/ALCAM) και την απουσία των αιμοποιητικών δεικτών.

Πιο συγκεκριμένα ο χαρακτηρισμός τους θα πραγματοποιηθεί σε επίπεδο RNA αρχικά με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης ακολουθούμενης από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), καθώς και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης γονιδιακών δεικτών εμβρυϊκού μεσεγχυματικού και μη χαρακτήρα.

Δεύτερος κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του εύρους διαφοροποίησης των AF-MSCs κάτω από κατάλληλες καλλιεργητικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα με βάση την εκτεταμένη βιβλιογραφία, όσον αφορά τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, έχει διαπιστωθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, όπως σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, [20] και μυοβλάστες [74]. Επιπλέον, *in vivo* μελέτες μεταμοσχεύσεως έχουν αποδείξει ότι τα MSC έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα της εξωδερμικής σειράς, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα [75]. Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών και ομφαλοπλακουντιακό αίμα δύνανται να διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα της ενδοδερμική σειράς [45].

Στην παρούσα έρευνα θα ακολουθηθούν πρωτόκολλα διαφοροποίησης των AF-MSCs προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, όπως είναι τα λιποκύτταρα και οι οστεοβλάστες, προς κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα και προς νευρικά κύτταρα, που ανήκουν στην ενδοδερμική σειρά. Ο χαρακτηρισμός των προκυπτόντων κυτταρικών τύπων θα πραγματοποιηθεί σε επίπεδο α) RNA, με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης ακολουθούμενης από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) και β) σε επίπεδο πρωτεϊνών με εφαρμογή ανοσοιστοχημικών μεθόδων. Η πιθανότητα να καταστεί δυνατή η επαγωγή διαφοροποίησης των AF-MSCs σε κύτταρα και των τριών γαμετικών στιβάδων θα αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό εύρημα για μελλοντικές κλινικές προεκτάσεις.

Τέλος, θα μελετηθεί περαιτέρω η ικανότητα δια-διαφοροποίησης των AF-MSCs. Πιο συγκεκριμένα, αφού διαπιστωθεί η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς δεδομένες κυτταρικές σειρές, μετά από καλλιέργειά τους με τα κατάλληλα πρωτόκολλα διαφοροποίησης, θα ακολουθήσει καλλιέργειά τους σε συνθήκες που επάγουν διαφοροποίηση προς τις υπόλοιπες κατευθύνσεις. Για παράδειγμα, αφού πραγματοποιηθεί η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς λιποκύτταρα, στη συνέχεια θα καλλιεργηθούν ξεχωριστά κάτω από διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες διαφοροποίησης, προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα δια-διαφοροποίησης προς οστεοβλάστες. Κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών αυτών τα κύτταρα θα ελέγχονται για την έκφραση δεικτών μεσεγχυματικότητας, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσον η τυχόν δια-διαφοροποίησή τους πραγματοποιείται μέσω προηγούμενης από-διαφοροποίησης (de-differentiation).

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Απομόνωση μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων από αμνιακό υγρό και μελέτη καρυοτύπου

Μετά από αμνιοκέντηση, που πραγματοποιείται κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης (16-19 εβδομάδα) λαμβάνονται 10–20ml αμνιακού υγρού, κατόπιν εγκρίσεως του εντύπου συγκατάθεσης από το Διοικητικό Συμβούλιο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και από τις Επιτροπές Δεοντολογίας των Νοσοκομείων Αλεξάνδρα και ΙΑΣΩ.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1300rpm για 10 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer). Τα κύτταρα, περίπου 1000–5000/cm³, επαναδιαλύονται σε 6ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) με 20% εμβρυϊκό ορό αγελάδος [fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL, Paisley, Scotland, UK)], 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 1% γλουταμίνη και αφήνονται για επώαση σε υγρό, επωαστικό κλίβανο 5%CO₂, 37°C για 20 ημέρες, όπου αρχίζουν να σχηματίζονται οι πρώτες αποικίες. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται ανά 5 ημέρες.

Για την καρυοτυπική ανάλυση των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού πραγματοποιήθηκε λήψη 5 διαφορετικών δειγμάτων AF-MSCs, τα οποία βρίσκονταν στη λογαριθμική φάση του σταδίου ανάπτυξης. Στη συνέχεια έγινε χρώση των AF-MSCs με χρωστική Giemsa, GTG ζωνοποίηση. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε μελέτη 20 μεταφάσεων. Η καρυοτυπική ανάλυση έγινε στο εργαστήριο της Βιογενομικής [(Biogenomica), Παπανικολή 4, Χαλάνδρι].

3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Ύστερα από λήψη ομφαλοπλακουντιακού αίματος, μετά το πέρας του τοκετού πραγματοποιείται αραιώση του δείγματος (1:1) σε διάλυμα HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich). Κατόπιν το αραιωμένο δείγμα επιστιβάζεται σε διάλυμα φικόλλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1910 rpm για 30 λεπτά, χωρίς φρένο, σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, λαμβάνεται η ενδιάμεση στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων και πραγματοποιείται (1:3) αραιώση αυτών σε διάλυμα HBSS και φυγοκέντρηση στις

1600 rpm για 5 λεπτά. Κατόπιν, επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων [Red Blood Cell lyses buffer, (155mM χλωριούχο αμμώνιο, 10mM διπανθρακικό νάτριο, 0.1 mM EDTA)].

Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και η αντίδραση τερματίζεται με 1 ml FBS. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 λεπτά, πλύσιμο με HBSS και επαναδιάλυση των κυττάρων στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (DMEM-LG, 10% FBS, 1% P/S). Στη συνέχεια πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση $10^7 / \text{cm}^2$ στο παραπάνω θρεπτικό μέσο.

3.3 Καλλιέργεια μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών (BM MSCs)

Πραγματοποιήθηκε λήψη μεσεγγυματικών κυττάρων μυελού των οστών (BM-MSCs) από υγιείς δότες και ακολούθησε καλλιέργειά τους *in vitro* σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% (vol/vol) FBS. Επιπλέον, κάποια δείγματα BM-MSCs προμηθεύτηκαν από την Cambrex (Cambrex, Wokingham, Berkshire, UK, Lot. L2F1657), όπου η καλλιέργειά τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.4 Κινητική Αύξησης

Για τη μελέτη της κινητικής αύξησης χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα AF-MSCs και πραγματοποιήθηκε καλλιέργειά τους σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 24 πηγαδιών (24-well plate). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε κυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) ανά 24 ώρες και για χρονικό διάστημα 10 ημερών.

3.5 Κυτταρομετρία ροής

Για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, καθώς και για τη σύγκριση αυτών με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής.

Οι δείκτες που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

CD166 (SB10/ALCAM): εκφράζεται στους νευρώνες, σε ενεργοποιημένα T κύτταρα, σε ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες.

CD105 (Endoglin): εκφράζεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, στους συγκυτοτροφοβλάστες του πλακούντα, ενεργοποιεί τα μακροφάγα, και εμφανίζει ασθενή έκφραση στους στρωματικούς ινοβλάστες.

CD73 (ecto-5'-nucleotidase): Απαντά σε υπομονάδες των T και B λεμφοκυττάρων, σε δενδριτικά κύτταρα, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα.

CD90 (Thy-1): Εκφράζεται στο 1-4 % του ανθρώπινου εμβρυϊκού ήπατος, στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα και σε κύτταρα του μυελού των οστών.

CD44 (H-CAM): Απαντά σε λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και ασθενώς σε αιμοπετάλια.

CD45: Κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων (LCA), εκφράζεται σε όλα τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα, συμπεριλαμβάνοντας και τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, εωσινόφιλα και θυμοκύτταρα, αλλά απουσιάζει από τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια ή τα ώριμα ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών και των μη αιμοποιητικών ιστών.

CD14: Βρίσκεται στα μονομυελοκύτταρα και αποτελεί υποδοχέα των λιποπολυσακχαριτών και της πρωτεΐνης που προσδένεται σε λιποπολυσακχαρίτες (LBP).

CD34: Απαντά στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, στο αγγειακό ενδοθήλιο και στους ινοβλάστες ορισμένων ιστών.

CD29: Ενεργοποιεί το αντιγόνο VLA, όπου οι VLA υποδοχείς αλληλεπιδρούν με συνδέτες, όπως το VCAM-1 και MadCAM-1 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής προσκόλλησης. Επιπλέον αλληλεπιδρούν με συστατικά του ενδοθηλίου, όπως είναι κολλαγόνο, λαμινίνη και φιβρονεκτίνη.

CD49e: Αλληλεπιδρά με την α_5 -ιντεγκρίνη, η οποία μαζί με την ιντεγκρίνη 1 (CD29) συμμετέχει στο σχηματισμό του VLA-5, ενός υποδοχέα φιβρονεκτίνης που εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους.

CD49d: Αναγνωρίζει την α4 αλυσίδα του VLA-4, μέλους της οικογένειας των ιντεγκρινών, των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης.

CD11α: Απαντά στα λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα. Η αL υπομονάδα της ιντεγκρίνης LFA-1 προσδέεται στο CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), κα στο CD50 (ICAM-3).

CD62P: P-σελεκτίνη

CD62E: E-σελεκτίνη

CD54: Εκφράζεται στα T και B λεμφοκύτταρα, στα μακροφάγα και στα κοκκιοκύτταρα. Επιπλέον, απαντά στους ινοβλάστες, στα επιθηλιακά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

CD50: Εκφράζεται σε όλα τα λευκοκύτταρα, στα κύτταρα του Langerhans και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

CD31: Απαντά στα μονοκύτταρα, αιμοπετάλια, T-κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Αποτελεί μόριο προσκόλλησης που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου και ενδοθηλίου-ενδοθηλίου.

CD106: Αποτελεί συνδέτη της ιντεγκρίνης των λευκοκυττάρων VLA4.

CD1α: Βρίσκεται στα θυμοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans, τα δενδριτικά κύτταρα, τα B κύτταρα, το εντερικό επιθήλιο, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα αιμοφόρα αγγεία. Αποτελεί μόριο της τάξης MHC I-like molecule και αλληλεπιδρά με τη β₂ μικροσφαιρίνη, ενώ έχει και ειδικό ρόλο στην παρουσίαση λιπιδικών αντιγόνων.

CD133: Απαντά στα προγονικά/βλαστικά κύτταρα.

CD3: Απαντά στα θυμοκύτταρα, στα T κύτταρα και αλληλεπιδρά με το επιφανειακό αντιγόνο των T κυττάρων (TCR). Είναι απαραίτητο για την έκφραση και το σηματοδοτικό μονοπάτι που δημιουργείται από το TCR.

CD13: Βρίσκεται στα μυελομονοκύτταρα και αποτελεί μία μεταλλοπρωτεΐνωση ψευδαργύρου.

Η πειραματική διαδικασία για τη χρώση των κυττάρων με σκοπό την ανάλυση του προτύπου έκφρασής τους με κυτταρομετρία ροής είναι η ακόλουθη. Τα κύτταρα (5×10^4 - 10^5 /δείγμα) τρυψινοποιούνται και φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS, φυγοκεντρείται και στη συνέχεια προστίθενται 200μl διαλύματος PBS με Fc Block Reagent (1:50) ενώ στη συνέχεια προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα σε αναλογία (1:100). Ακολουθεί επώαση στους 4°C για μία ώρα, πλύσιμο με PBS και φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 5 λεπτά.

Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του υπερκείμενου και μονιμοποίηση με 400μl 0.5% παραφορμαλδεύδη για όσα δείγματα έχουν συνδεδεμένο αντίσωμα.

Στα δείγματα που δεν έχουν συνδεδεμένο αντίσωμα προστίθεται διάλυμα PBS με δεύτερο αντίσωμα (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat antimouse IgG secondary antibody, DAKO DakoCytomation Ltd, Cambridgeshire UK) σε αναλογία 1:100 και τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 45 min. Ακολουθεί πλύσιμο με PBS και μονιμοποίηση με 400μl 0.5% PFA. Τέλος, πραγματοποιείται η ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής (Beckman Coulter Ltd, Palo Alto, Ca) με τη χρήση του προγράμματος CXP. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student's t-Test.

3.6 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται με δύο μεθόδους, εκ των οποίων η πρώτη περιλαμβάνει τη χρήση του RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Fleming Way, Crawley, West Sussex, United Kingdom) όπου ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Η δεύτερη μέθοδος απομόνωσης του RNA πραγματοποιείται με το αντιδραστήριο TRI REAGENT, το οποίο αποτελεί ένα μίγμα φαινόλης και θειοκυανίου γουανιδίνης σε μονοφασικό διάλυμα, που μπορεί αποτελεσματικά να διαλύσει το RNA, μετά από λύση του ιστού. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα ομογενοποιούνται με το αντιδραστήριο TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) και για να επιτευχθεί πλήρης διάλυση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων προστίθενται 0.2ml χλωροφορμίου για κάθε 1 ml TRI REAGENT. Στη συνέχεια το δείγμα ανακινείται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το μείγμα κατά αυτό τον τρόπο διαχωρίζεται σε 3 φάσεις, εκ των οποίων, η κόκκινη φάση περιέχει τις πρωτεΐνες, η ενδιάμεση φάση περιέχει το DNA και η διαυγής στοιβάδα το RNA. Αυτή η στοιβάδα συλλέγεται σε νέο σωλήνα, όπου και προστίθενται 0.5 ml ισοπροπανόλης για κάθε 1 ml TRI REAGENT και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί πλύση του ιζήματος του RNA με 1 ml 75% αιθανόλη για κάθε 1 ml TRI REAGENT και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 7500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30μl dH₂O, χωρίς RNAses (DEPC water) και φωτομέτρηση. Η μέθοδος

είναι πολύ αποτελεσματική και επιτρέπει την απομόνωση μορίων RNA με μήκος 0.1 έως 15 kb.

3.7 Παραγωγή cDNA

Σε 1μg mRNA προστίθεται 1μg από τον εκκινητή (oligo-dT) σε τελικό όγκο 14μl σε dH₂O. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 5 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί η δευτεροταγής δομή. Το μίγμα ψύχεται, ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του RNA και προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Μίγμα Αντίδρασης M-MLV RT 5X , [dATP, dCTP, dGTP, dTTP, (10mM)] και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης [M-MLV RT (H-)] (Promega, Madison, WI, USA) σε τελικό όγκο 25 μl σε dH₂O. Με την προσθήκη των oligo-dT επιτρέπεται η υβριδοποίηση με τις πολύ-A ουρές των mRNA μορίων, δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο το πρωταρχικό τμήμα για να δράσει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, που χρησιμοποιώντας το RNA ως μήτρα μπορεί να συνθέσει μια αλυσίδα DNA. Το μίγμα επωάζεται αρχικώς για 10 λεπτά στους 40°C και κατόπιν στους 40–55°C για 50 λεπτά.

3.8 PCR

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν η ThermoStart DNA polymerase και τα αντίστοιχα αντιδραστήρια (Abgene Inc., Rochester, NY, USA), καθώς και οι κατάλληλοι εκκινητές.

Πιο συγκεκριμένα για την πιστοποίηση του πρώιμου εμβρυϊκού σταδίου των AF-MSCs χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών: (Oct-4 Forward primer: C G A C C A T C T G C C G C T T T T G A G και Oct-4 Reverse primer: (C C C C C T G T C C C C C A T T C C T A).

Για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης προς ηπατοκύτταρα, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών, που αντιστοιχεί στο γονίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης: (Albumin Forward primer: 5' T G C T T G A A T G T G C T G A T G A C A G G G 3' και Albumin Reverse primer: 5' A A G G C A A G T C A G C A G G C A T C T C A T C 3').

Για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης προς νευρικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη των εκκινητών, που αφορούν την ανθρώπινη νεστίνη (human nestin) και τη νευρο-ειδική ενολάση (neuron specific enolase, NSE), των οποίων οι αλληλουχίες είναι οι ακόλουθες: (Nestin Forward primer: 5' C A G C T G G C G C A C C T C A A G A T G 3' και Nestin Reverse primer: 5' A G G G A A G T T G G G C T C A G G A C T G G 3'), καθώς και (NSE Forward primer: 5' C C C A C T G A T C C T T C C C G A T A C A T 3' και NSE Reverse primer: 5' C C G A T C T G G T T G A C C T T G A G C A 3').

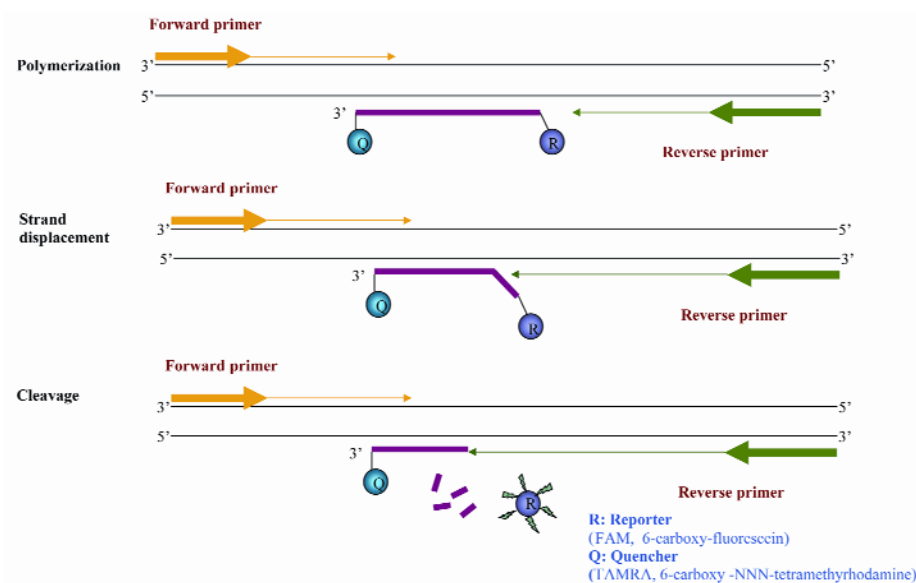
Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (β-actin Forward primer: 5' T C T A C A A T G A G C T G C G T G T G 3' και β-actin Reverse primer: 5' C A A C T A A G T C A T A G T C C G C C 3').

3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ένας φθορίζων ανιχνευτής που διαθέτει μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter dye) στο 5' άκρο του και μία χρωστική απόσβεσης (quencher dye) στο 3' άκρο, καθώς και δύο εκκινητές. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμεράσης, πραγματοποιείται κόψιμο του ανιχνευτή με το AmpliTaq Gold ένζυμο όπου διαχωρίζεται το χρώμα αναφοράς από το χρώμα απόσβεσης, γεγονός που καταλήγει στην αύξηση φθορισμού του χρώματος αναφοράς. Η αύξηση των παραγώγων της PCR αντίδρασης παρατηρείται αμέσως μετά την αυξημένη ένταση φθορισμού με ειδική κάμερα. Για κάθε αντίδραση εμφανίζεται ένα σήμα φθορισμού στο σημείο όπου το δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης και ορίζεται ως το «κατώφλι» της μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Η μεταβολή συγκέντρωσης σε συγκεκριμένο κύκλο εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του προϊόντος (Εικόνα 5).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) πραγματοποιήθηκε στη συσκευή ABI Prism 7700 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA). Κάθε δείγμα cDNA αναμιγνύεται με ειδικούς εκκινητές και ένα συγκεκριμένο αντιδραστήριο (PCR master mix, Applied Biosystems, No 4312704). Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (TaqMan Real-Time PCR) πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο Oct-4 (Applied Biosystems,

Hs00742896_s1), του οποίου η έκφραση υπολογίστηκε με εκκινήτες, που σχεδιάστηκαν με συγκεκριμένα πρωτόκολλα (Assays on Demand™, Gene Expression Products, Applied Biosystems). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ABI Prism 7700 SDS software (Applied Biosystems). Η έκφραση του Oct-4 κανονικοποιήθηκε με το μάρτυρα GAPDH (GAPDH, TaqMan pre-developed assay reagents, Applied Biosystems No 433764T).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).

3.10 Εντοπισμός του OCT-4 με μέθοδο ανοσοφθορισμού

Το OCT-4 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα και επομένως εντοπίζεται στον πυρήνα. Πειραματικά ο εντοπισμός του μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα η πειραματική διαδικασία είναι η εξής: Ένα έως πέντε $\times 10^4$ προσκολλημένα κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλη αντικειμενοφόρο πλάκα, που διαθέτει 8 υποδοχές (Becton-Dickinson) σε μέσο καλλιέργειας για AF-MSCs για 24 ώρες σε υγρό, επωαστικό κλίβανο 5% CO₂ σε θερμοκρασία 37⁰C. Τα κύτταρα πλένονται με PBS και μονιμοποιούνται σε 2% παραφορμαλδεύδη (Sigma-Aldrich) για 30 λεπτά. Ακολουθεί πλύσιμο με PBS και προσθήκη 0.2% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιείται δέσμευση με 10% FCS σε PBS για 20 λεπτά. Στη συνέχεια

ακολουθεί χρώση των κυττάρων με 1 µg/ml του αντισώματος Oct-3/4 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA) USA) σε PBS, που περιέχει 1.5% FCS για 60 λεπτά. Έπεται πλύσιμο και επώαση για 15 min με το δεύτερο αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με βιοτίνη και βρίσκεται σε αραιώση 1-5 µg/ml σε PBS, χωρίς την παρουσία ορού. Μετά πραγματοποιείται επώαση με στρεπταβιδίνη–φλουορεσκίνη (Becton Dickinson, San Jose, CA) για 15 λεπτά σε σκοτεινό χώρο και πλύσιμο με PBS. Στα δείγματα προστίθεται ειδικό μέσο (Vectashield mounting medium, Vector laboratories Inc), που επιπλέον περιέχει διάλυμα πυρηνικής χρώσης DAPI και ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

3.11 Πρωτόκολλα Διαφοροποίησης AF-MSCs

3.11.1 Διαφοροποίηση προς Οστεοβλάστες

Τα AF-MSCs καλλιεργούνται για 3 εβδομάδες σε πλάκα μικροτιτλοποίησης (6–well plate) σε καλλιεργητικό μέσο DMEM–HG (high glucose) (Sigma-Aldrich), εμπλουτισμένο με 10% FBS, (Gibco-BRL, UK) 10 mM β-γλυκεροφωσφορικό οξύ (Sigma-Aldrich), 10^{-5} M δεξαμεθαζόνη (Sigma-Aldrich) και 0.3mM ασκορβικό οξύ (Sigma-Aldrich). Η αξιολόγηση των κυττάρων που έχουν διαφοροποιηθεί σε οστεοβλάστες γίνεται με τη μέθοδο ανίχνευσης αλκαλικής φωσφατάσης (δείκτης οστεοβλαστικής διαφοροποίησης). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε 10% φορμαλδεύδη και στη συνέχεια επωάζονται για 10 λεπτά με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, που συνίσταται από 100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl και 50 mM MgCl₂. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος και επώαση των κυττάρων με BCIP\NBT (Sigma-Aldrich) για 1,5 ώρα. Έπειτα πραγματοποιείται πλύσιμο με dH₂O και 70% αιθανόλη και ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

3.11.2 Διαφοροποίηση προς Λιποκύτταρα

Η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς λιποκύτταρα πραγματοποιείται σε 40% DMEM–HG (Sigma-Aldrich) και 50% Ham F12 (Gibco-BRL, UK) καλλιεργητικό

υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό (rabbit serum) (Sigma-Aldrich), 10^{-2} μ M δεξαμεθαζόνη (Sigma-Aldrich), 0.5 mg/ml ινσουλίνη (Sigma-Aldrich), 2mM γλουταμίνη και αντιβιοτικά (50 U/ml πενικιλίνη\50 mg/ml στρεπτομυκίνη). Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 2-3 εβδομάδες και η αξιολόγηση των διαφοροποιημένων κυττάρων γίνεται με τη χρήση χρώσης Oil Red O για την παρουσία σταγονιδίων λιπών. Κατά αυτή τη διαδικασία τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε διάλυμα 10% φορμαλδεύδης (10% σε PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύσιμο με ισοπροπανόλη για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώαση με Oil Red O σε 60% διάλυμα ισοπροπανόλης για 10 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 3 πλυσίματα με dH₂O, απομάκρυνση του αντιδραστηρίου που δεν έχει προσδεθεί και επώαση με 100% ισοπροπανόλη για 15 λεπτά. Ακολουθεί παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

3.11.3 Διαφοροποίηση προς Ηπατοκύτταρα

Η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς ηπατοκύτταρα γίνεται με βάση δημοσιευμένα πρωτόκολλα, σύμφωνα με τα οποία 1.3×10^4 κύτταρα/cm² καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma-Aldrich), χωρίς ορό και εμπλουτισμένο με 20ng/ml EGF [Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας (Epidermal Growth Factor, Peprotech House, London, UK)] και 10ng/ml bFGF [βασικός Ινοβλαστικός Αυξητικός Παράγοντας (basic Fibroblast Growth Factor, Peprotech House, London, UK)] για 2 ημέρες. Στη συνέχεια προστίθεται το αρχικό μέσο καλλιέργειας που συνίσταται από IMDM, 20ng/ml HGF [Ηπατοκυτταρικός Αυξητικός Παράγοντας (Hepatocyte Growth Factor, Peprotech, UK)], 10ng/ml bFGF (Peprotech UK) και DMSO (0.1%, Sigma-Aldrich), και τα κύτταρα αφήνονται για επώαση για 1 εβδομάδα. Τέλος, προστίθεται το δεύτερο θρεπτικό μέσο, που συνίσταται από IMDM, 20ng/ml ονκοστατίνη M (Peprotech UK), 1 μ mol/L δεξαμεθαζόνη (Sigma-Aldrich), και 50ng/ml ITS⁺ (Sigma-Aldrich). Πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού 2 φορές ανά εβδομάδα και μετά από 15 ημέρες τα κύτταρα έχουν ήδη διαφοροποιηθεί σε ηπατοκύτταρα [45].

3.11.3.1 Πρόσληψη Λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας

Η αξιολόγηση της διαφοροποίησης των AF-MSCs προς ηπατοκύτταρα πραγματοποιείται με την παρατήρηση της πρόσληψης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής

πυκνότητας (LDL). Πιο συγκεκριμένα τα διαφοροποιημένα AF-MSCs σε ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα μάρτυρες μετά από προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM-HG (Sigma-Aldrich) εμπλουτισμένου με 2.5μg/ml Fluor 488-ACLDL, απουσία ορού, επωάζονται σε κλίβανο 5% CO₂, σε θερμοκρασία 37⁰C. Η χρώση με τη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL)(Alexa Fluor 488 ACLDL) πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Molecular Probes, Molecular Eugene, Oregon, USA). Μετά το πέρας 24 ωρών πραγματοποιείται παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο (T-300 Nikon) και ανάλυσή τους σε κυτταρομετρητή ροής (Beckman Coulter Ltd, Palo Alto, Ca).

3.11.4 Διαφοροποίηση προς Νευρικά κύτταρα

Τα AF-MSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα μετά από καλλιέργειά τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο για χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων. Πιο συγκεκριμένα, AF-MSCs, που βρίσκονται στο πέμπτο έως έβδομο στάδιο έκπτυξης καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό, που συνίσταται από DMEM-HG, που περιέχει 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνη (Sigma-Aldrich), 1% μη-απαραίτητα αμινοξέα (Gibco-BRL, UK), 55 μM 2-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich), 1 mM φωσφορικό νάτριο (Gibco-BRL, UK), 5x10⁻⁵M ρετινικό οξύ (Sigma-Aldrich) και 10ng/ml bFGF.

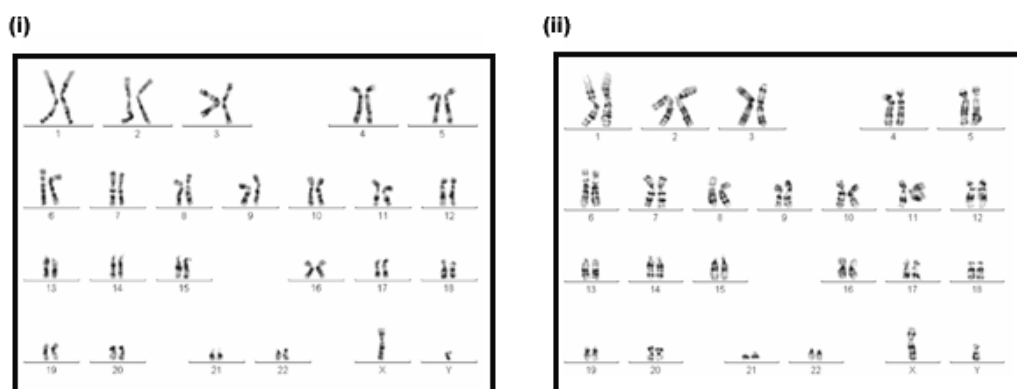
4. Αποτελέσματα

4.1 Καρυοτυπική Ανάλυση των AF-MSCs

Η καρυοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πέντε διαφορετικά δείγματα, των οποίων τα στάδια έκπτυξης ποίκιλλαν από 2 έως 17.

Επιπλέον, τα τρία δείγματα ήταν αμιγώς αρσενικά, γεγονός που επιβεβαιώνει την εμβρυϊκή προέλευση των συγκεκριμένων κυττάρων του αμνιακού υγρού. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από συμπληρωματική μελέτη αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας για το γονίδιο SRY, γονίδιο καθορισμού φύλου του Y χρωμοσώματος.

Όπως διαπιστώνεται οι καρυότυποι παραμένουν φυσιολογικοί (Εικόνα 6), γεγονός που καθιστά τα κύτταρα αυτά ιδιαίτερα σημαντικά για μελλοντική τους εφαρμογή στην κυτταρική θεραπεία.

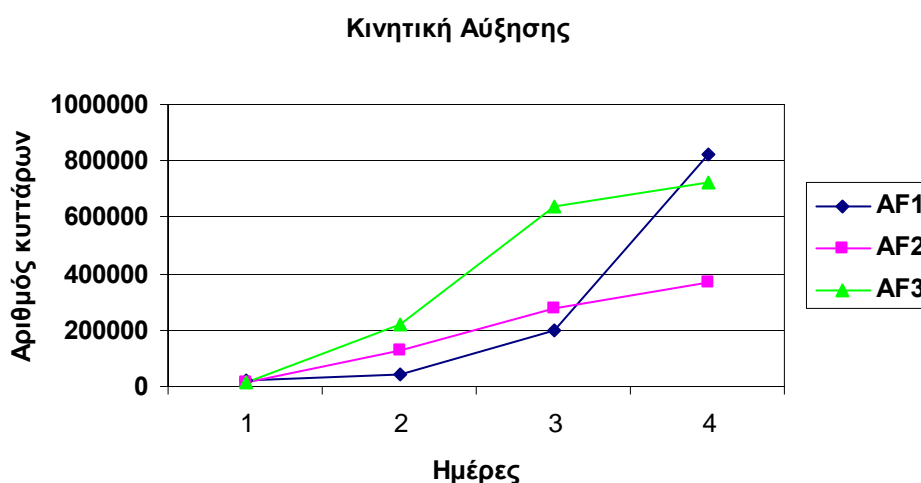


Εικόνα 6: Φυσιολογικός καρυότυπος από AF-MSCs, προερχόμενα από αρσενικό έμβryo I) στο στάδιο έκπτυξης 2 και II) στο στάδιο έκπτυξης 17.

4.2 Κινητική Αύξησης των AF-MSCs

Η μελέτη της κινητικής αύξησης πραγματοποιήθηκε σε τρία δείγματα AF-MSCs για χρονικό διάστημα 4 ημερών. Η μέτρηση των κυττάρων γινόταν ανά 24 ώρες και στη συνέχεια κατασκευάστηκε η καμπύλη αύξησης για κάθε δείγμα (Εικόνα 7). Διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των AF-MSCs επιταχύνεται με το χρόνο και η καμπύλη ακολουθεί μία λογαριθμική αύξηση, όπου τα κύτταρα διαιρούνται με

εκθετικό ρυθμό από την 1^η έως την 4^η ημέρα. Η λογαριθμική φάση ακολουθείται από τη φάση πλατώ.

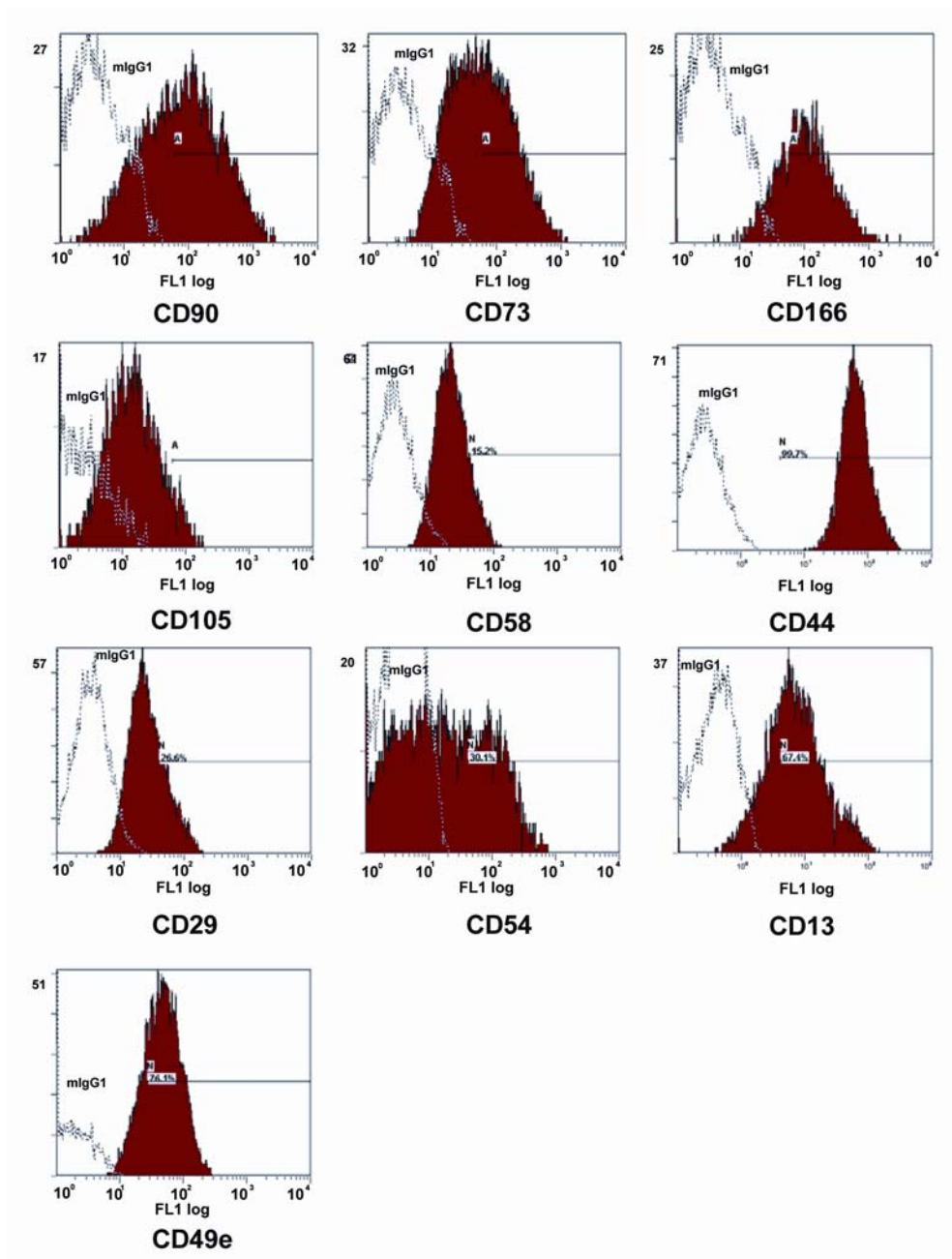


Εικόνα 7: Καμπύλη κινητικής αύξησης των AF-MSCs. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 10^4 κύτταρα/ cm^2 και παρατηρήθηκε διπλασιασμός των κυττάρων ανά 24 ώρες.

4.3 Συγκριτική Μελέτη των AF-MSCs, UCB-MSCs και BM-MSCs με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

Πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής ανάλυση των επιφανειακών αντιγόνων των AF-MSCs με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό δεικτών. Τα AF-MSCs τα οποία μελετήθηκαν βρίσκονταν σε στάδια έκπτυξης, που ποίκιλλαν από 3 έως 17.

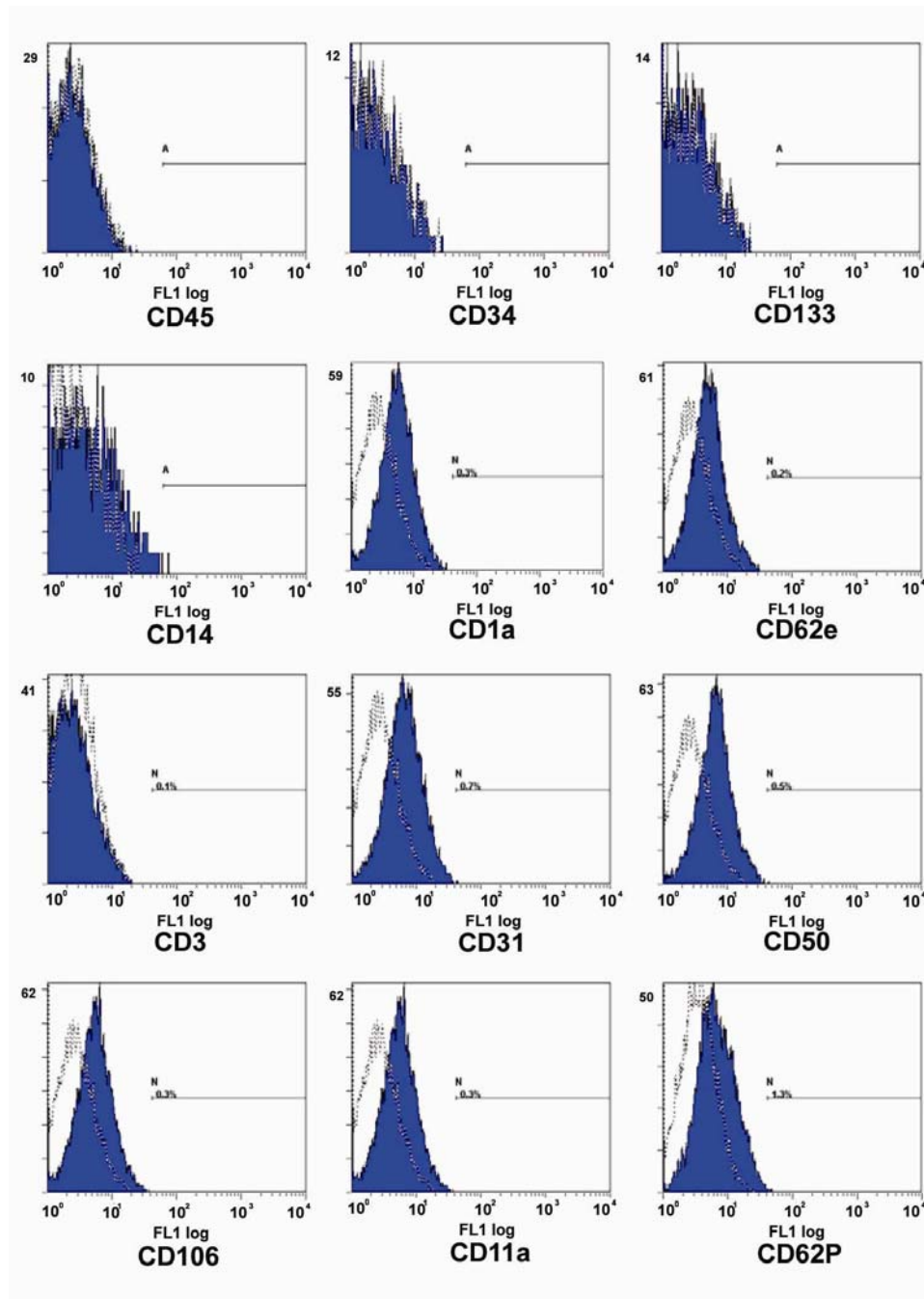
Μετά την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι τα AF-MSCs ήταν θετικά για μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως τα CD90 (Thy-1), CD73 (SH3, SH4), CD105 (endoglin) και CD166 (SB10/ALCAM). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα ήταν θετικά για τους δείκτες CD44, CD49e και CD29. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν για τα CD13, CD58 και CD54 (ICAM-1) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ενδεικτικοί θετικοί δείκτες των AF-MSCs (κόκκινα γραφήματα) και του αρνητικού μάρτυρα (mIgG1)(διακεκομμένης γραμμής γραφήματα).

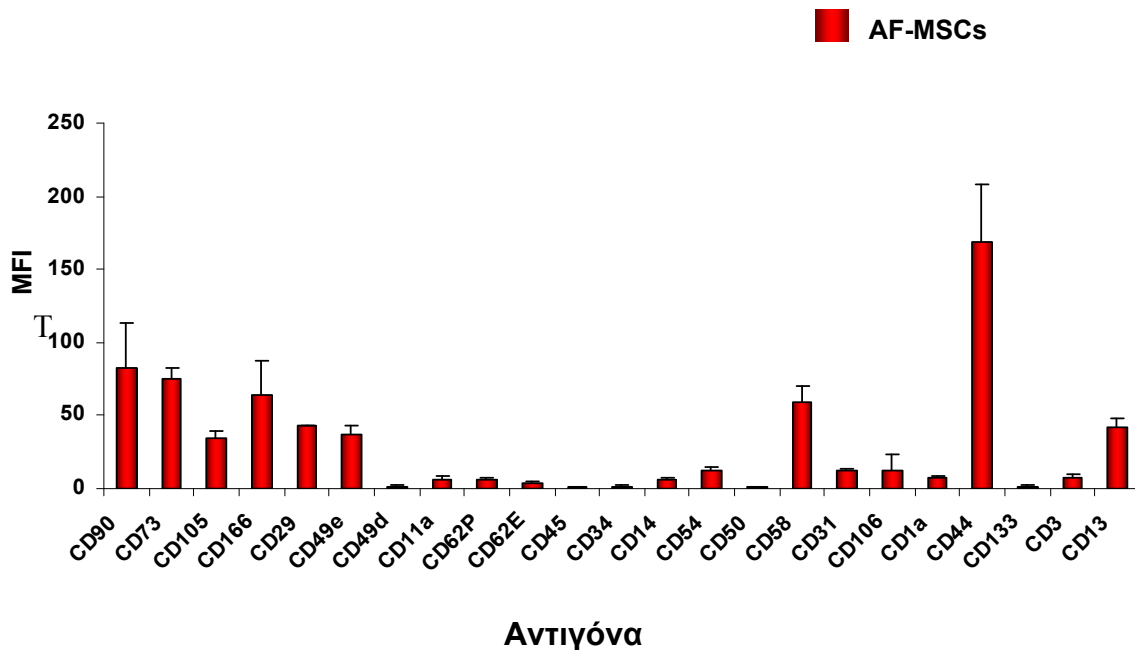
Πιο λεπτομερής ανάλυση απέδειξε ότι τα AF-MSCs ήταν αρνητικά για ενδοθηλιακούς δείκτες, όπως είναι τα CD133 (προμινίνη 1), CD34, CD45 (κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων) και CD14 (υποδοχέας λιποπολυσακχαριτών). Επιπλέον, δεν υπήρχε έκφραση μορίων της Ig υπεροικογένειας, όπως είναι τα CD1a (MHC-παρόμοια γλυκοπρωτεΐνη), CD31 (PECAM-1), CD50 (ICAM-3) και CD106 (VCAM-1). Τα AF-MSCs ήταν αρνητικά και για ιντεγκρίνες, όπως το CD11A (IFA-

1), καθώς και για σελεκτίνες, όπως το CD62P (P-σελεκτίνη). Τέλος, δεν ανιχνεύθηκαν αιμοποιητικοί δείκτες, όπως το CD50 (ICAM-3), (Εικόνα 9).



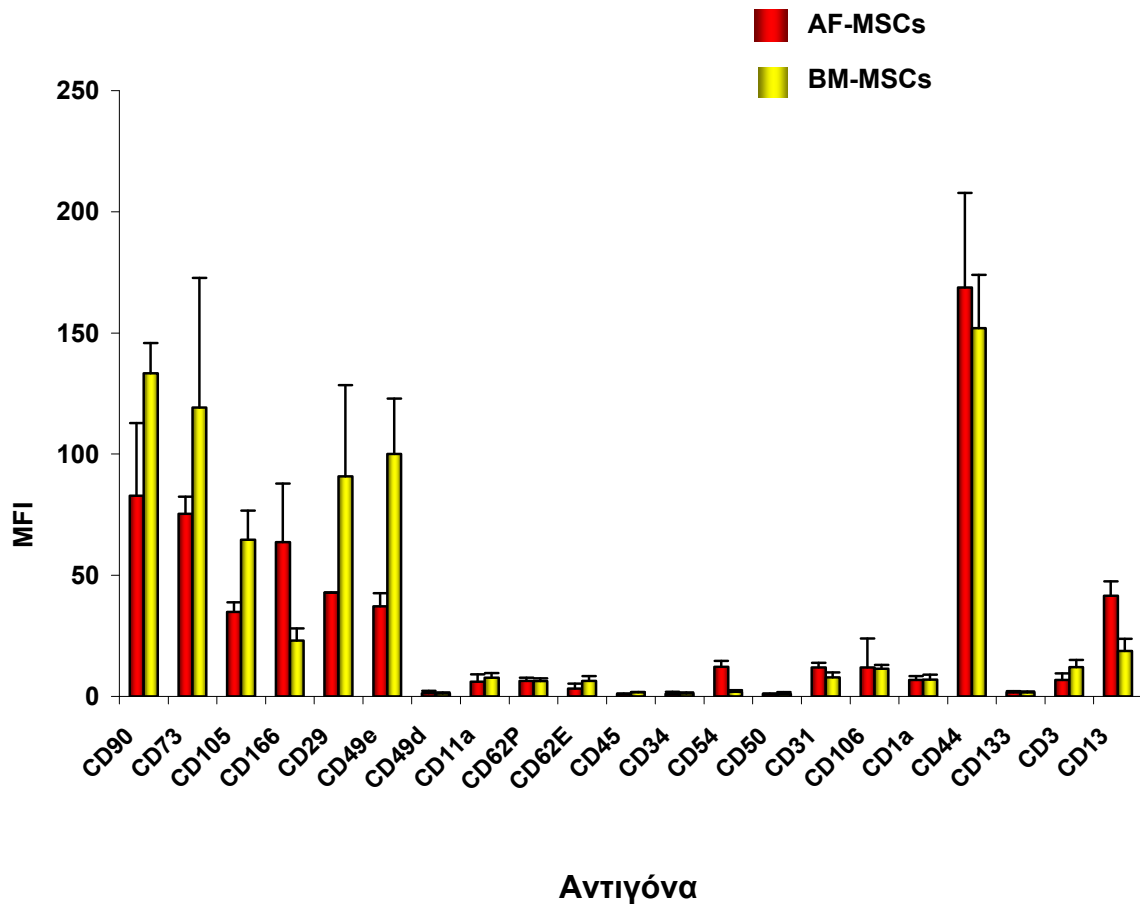
Εικόνα 9: Αρνητικοί δείκτες για τα AF-MSCs (μπλε γραφήματα) και του αρνητικού μάρτυρα (mIgG1)(διακεκομμένης γραμμής γραφήματα).

Τα επίπεδα έκφρασης των επιμέρους δεικτών συνοψίζονται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10: Ανάλυση του προτύπου έκφρασης των AF-MSCs, όπου MFI= Μέση Ένταση Φθορισμού (Median Fluorescent Intensity).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών μεταξύ MSCs από αμνιακό υγρό (AF-MSCs) και από μυελό των οστών (BM-MSCs). Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι τα MSCs και των δύο πηγών, που καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες είχαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση όμοιων αντιγόνων. Εντούτοις παρουσιάστηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για τους δείκτες CD166 και CD54, όσον αφορά τα AF-MSCs ($p < 0,06$ και $p < 0,08$, αντίστοιχα) και για τα CD29 και CD49e αναφορικά με τα BM-MSCs ($p < 0,04$ και $p < 0,1$ αντίστοιχα) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Συγκριτική μελέτη προτύπου έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών μεταξύ AF-MSCs και BM-MSCs, όπου MFI (Median Fluorescent Intensity). = Μέση Ένταση Φθορισμού

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και συγκριτική μελέτη της έκφρασης δεικτών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από αμνιακό υγρό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα, όπου διαπιστώθηκε ότι επίσης παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και με τη χρήση ίδιων αντιγόνων. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του μορίου προσκόλλησης CD44 (HCAM-1) στα UCB-MSCs σε σχέση με τα MSCs από αμνιακό υγρό ($p < 0,1$), (Εικόνα 12).



MFI

Αντιγόνα

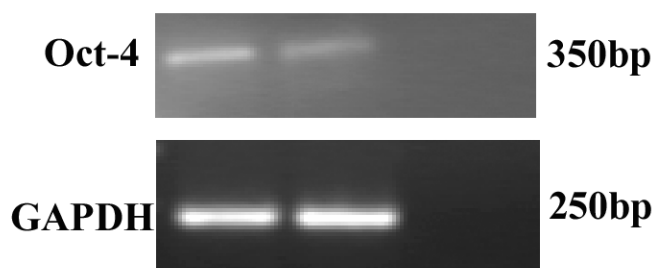
Εικόνα 12: Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης επιφανειακών δεικτών ανάμεσα σε AF-MSCs και UCB-MSCs, όπου MFI= Μέση Ένταση Φθορισμού .

4.4 Έκφραση γονιδίων εμβρυϊκού χαρακτήρα

4.4.1 PCR

Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου Oct-4 σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Το Oct-4 (Octomer-binding Transcription Factor 4) αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, που χαρακτηρίζει την κυτταρική ολοδυναμικότητα και κατά αυτό τον τρόπο παρέχει ενδείξεις για την ύπαρξη υποπληθυσμών βλαστικών κυττάρων στο AF.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH, (Εικόνα 13).

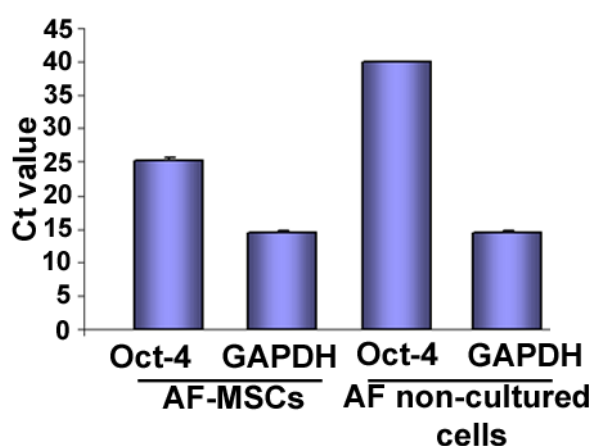


Εικόνα 13: PCR ανάλυση για την έκφραση των Oct-4 και GAPDH (μάρτυρας) σε δύο διαφορετικά δείγματα AF-MSCs (A,B). Γ:αρνητικός μάρτυρας

4.4.2 Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

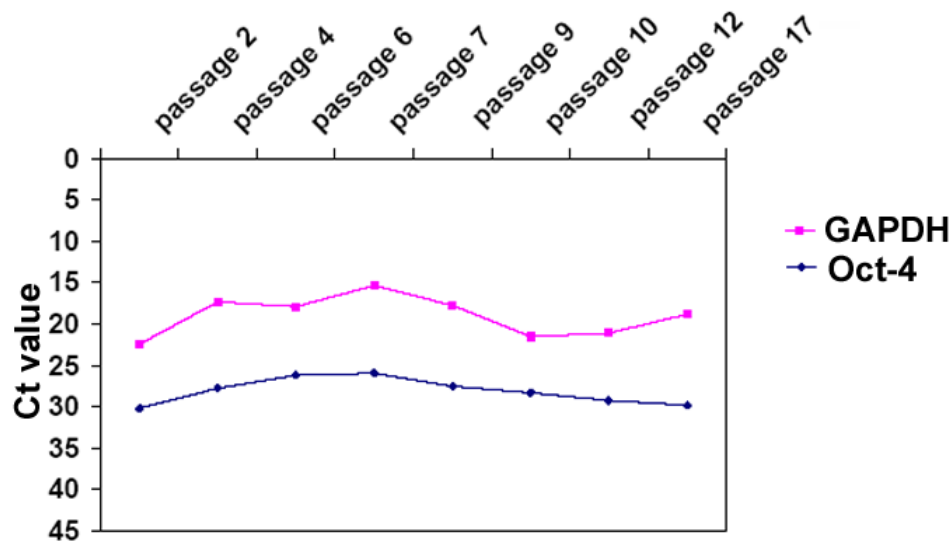
Έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του Oct-4 σε 4 διαφορετικά δείγματα και για 1-17 στάδια έκπτυξης για κάθε δείγμα, μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 14) διαπιστώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου Oct-4 δεν παρατηρήθηκε σε μη-καλλιεργούμενα κύτταρα του αμνιακού υγρού (39-40 κύκλοι), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα AF-MSCs είναι ένας υποπληθυσμός με υψηλό ποσοστό βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 14: Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του Oct-4 σε καλλιεργημένα και μη AF-MSCs. CT Value: αντιπροσωπεύει τον αριθμό των PCR κύκλων. GAPDH: Θετικός Μάρτυρας. Οι τιμές αποτελούν αριθμητικές μέσες τιμές (mean ± SEM) για 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε η καμπύλη έκφρασης του Oct-4 στα διαφορετικά στάδια έκπτυξης, κατά τη διάρκεια διαδοχικών ανακαλλιεργειών (P2-P17) των AF-MSCs. Επίσης, έγινε εξέταση του ενδογενούς θετικού μάρτυρα GAPDH (Εικόνα 15).

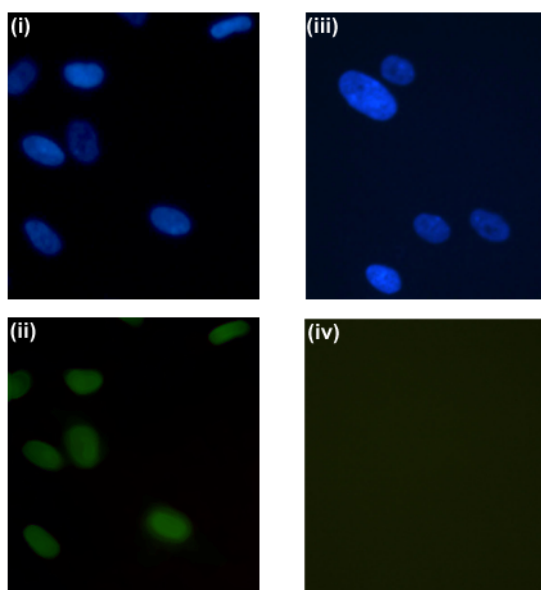


Εικόνα 15: Καμπύλη έκφρασης του Oct-4 στα AF-MSCs. Η τιμή Ct (Ct Value) αντιπροσωπεύει τον αριθμό των PCR κύκλων. Θετικός Μάρτυρας GAPDH. Οι τιμές αποτελούν αριθμητικές μέσες τιμές (mean ± SEM) για 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Από την παραπάνω καμπύλη διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του Oct-4 παραμένει σχετικά σταθερή συγκρινόμενη με την έκφραση του ενδογενούς μάρτυρα GAPDH, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του αμνιακού υγρού διατηρούν την πολυδυναμία τους για αρκετά στάδια έκπτυξης.

4.4.3 Εντοπισμός της πυρηνικής πρωτεΐνης Oct-4 με μέθοδο ανοσοφθορισμού

Το Oct-4 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα, που εκφράζεται στα εμβρυονικά κύτταρα και εντοπίζεται στον πυρήνα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων ήταν θετικό για το Oct4, γεγονός που υποδηλώνει την εμβρυονική τους προέλευση, (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Πυρηνική χρώση για το Oct4 με ανοσοφθορισμό:

DAPI χρώση (μπλε) για τον πυρήνα (i) θετική χρώση (πράσινο) για το Oct4 (ii) και (iii) DAPI χρώση με αρνητικό μάρτυρα μονοκλωνικό αντίσωμα ιδίου ιστύπου (isotype-matched rabbit IgG negative control mAb).

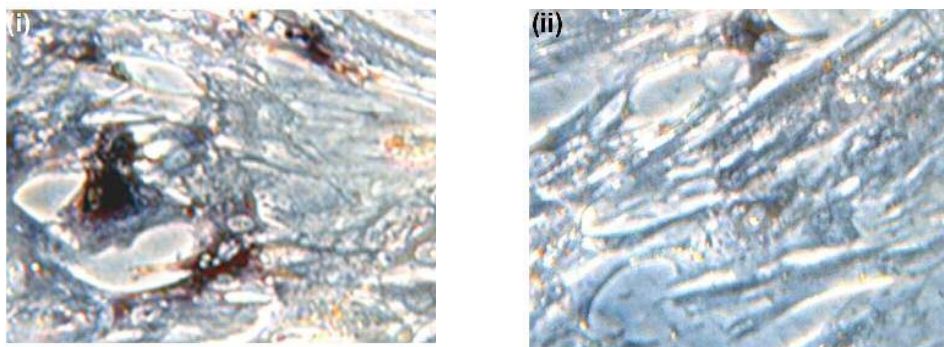
4.5 Διαφοροποίηση των AF-MSCs

4.5.1 Διαφοροποίηση προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς

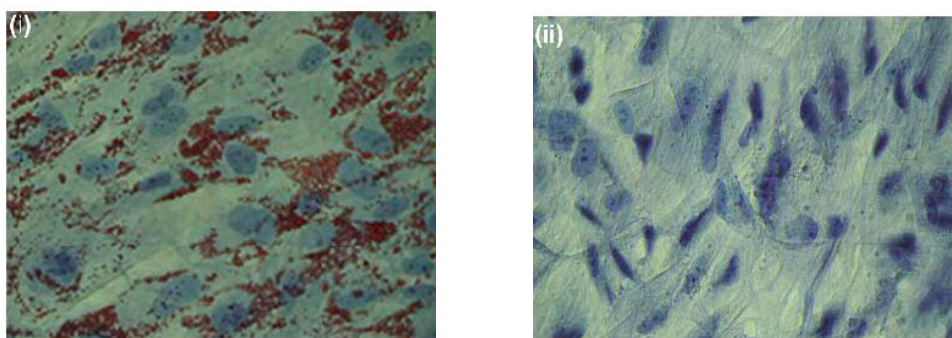
Πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, όπως οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς οστεοβλάστες πραγματοποιήθηκε μετά από καλλιέργειά τους σε οστεοβλαστικό θρεπτικό υλικό για διάστημα 3 εβδομάδων. Ο εντοπισμός τους γίνεται με κατάλληλη χρώση αλκαλικής φωσφατάσης, που αποτελεί δείκτη οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, (Εικόνα 17).

Η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς λιποκύτταρα επιτεύχθει αρχικώς με καλλιέργεια για μία εβδομάδα σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και ολοκληρώθηκε ύστερα από 2-3 εβδομάδες. Σε αυτό το χρονικό σημείο το μεγαλύτερο ποσοστό των

κυττάρων περιείχε λιπιδικά σφαιρίδια, τα οποία πιστοποιήθηκαν με τη χρώση Oil Red O, (Εικόνα 18).



Εικόνα 17: Χρώση αλκαλικής Φωσφατάσης σε (i) διαφοροποιημένα και (ii) μη διαφοροποιημένα AF-MSCs, ως μάρτυρες.

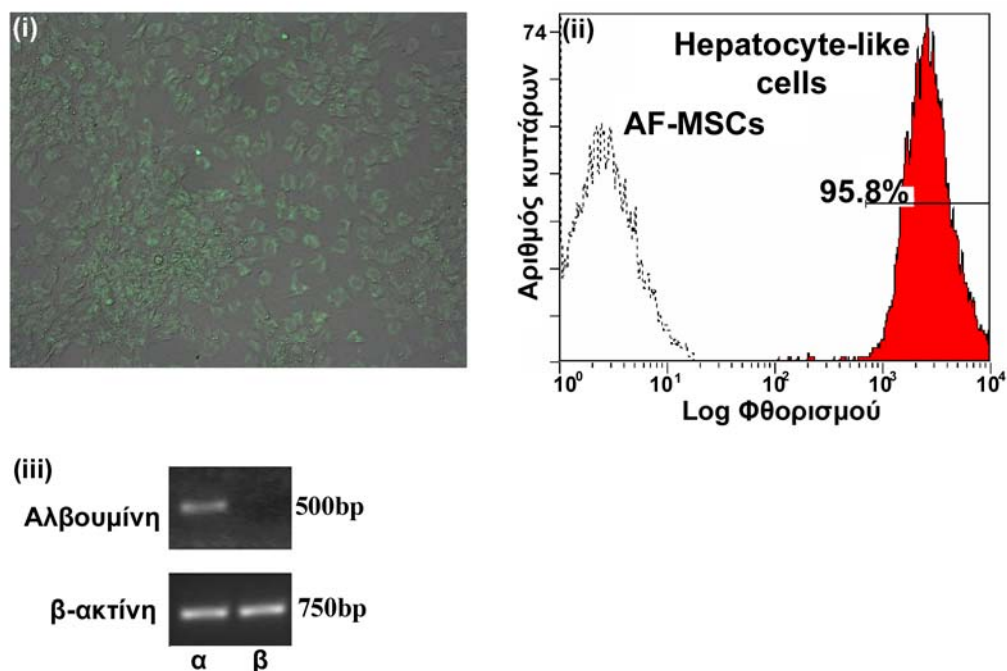


Εικόνα 18: Oil Red O χρώση σε (i) διαφοροποιημένα και (ii) μη διαφοροποιημένα AF-MSCs ως μάρτυρες.

4.5.2 Διαφοροποίηση προς ηπατοκύτταρα (ενδοδερμική σειρά)

Για τη μελέτη της διαφοροποίησης των AF-MSCs σε κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα απουσία ορού και παρουσία των παραγόντων HGF και bFGF έχασαν τη χαρακτηριστική μορφολογία ινοβλαστών που παρουσιάζουν τα MSCs και εμφάνισαν έναν επίπεδο, στρογγυλό φαινότυπο (Εικόνα 18i,ii). Η αξιολόγηση των ηπατοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με την παρατήρηση της πρόσληψης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και με μελέτη της έκφρασης του γονιδίου

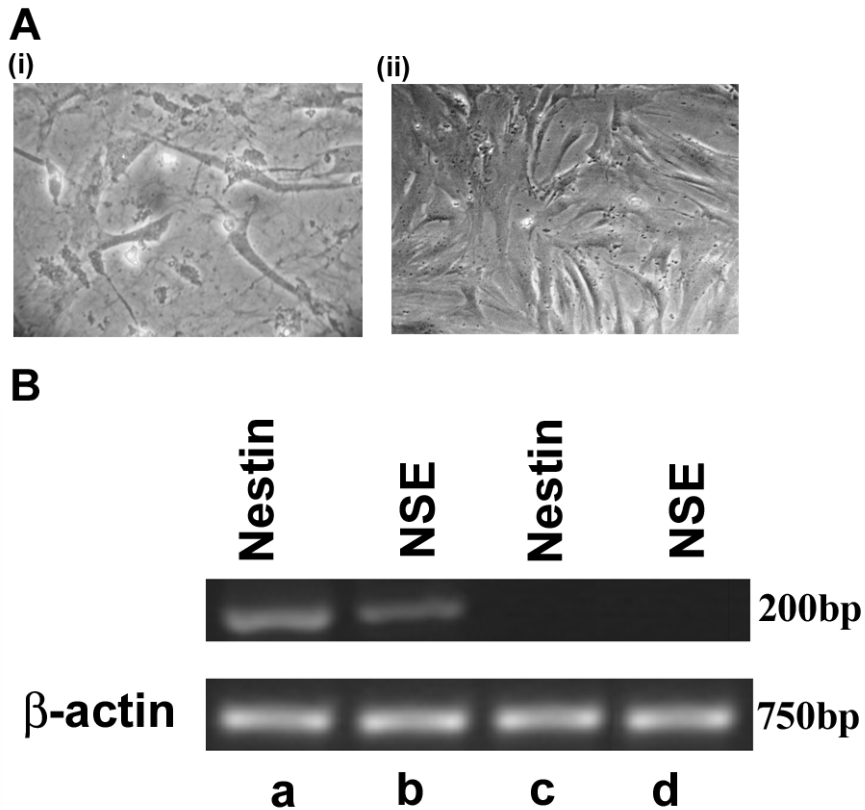
της αλβουμίνης, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Εικόνα 19 iii). Τα μη διαφοροποιημένα AF-MSCs δεν παρουσίαζαν ικανότητα πρόσληψης της LDL.



Εικόνα 19: i) Αξιολόγηση διαφοροποίησης προς ηπατοκύτταρα με βάση την πρόσληψη LDL, ii) Διάγραμμα FACS για τα ηπατοκύτταρα (κόκκινο ιστόγραμμα) και τα μη-διαφοροποιημένα AF-MSCs (διακεκομμένης γραμμής ιστόγραμμα), iii) PCR ανάλυση για τα α) διαφοροποιημένα προς ηπατοκύτταρα AF-MSCs και β) τα μη-διαφοροποιημένα AF-MSCs.

4.5.3 Διαφοροποίηση προς νευρικά κύτταρα (εξωδερμική σειρά)

Η διαφοροποίηση των AF-MSCs προς νευρικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε μετά από καλλιέργειά τους σε κατάλληλο μέσο για χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων. Τα διαφοροποιημένα AF-MSCs απέκτησαν μία λεπτή, ατρακτοειδή μορφολογία παρόμοια με την εικόνα των νευραξόνων (Εικόνα 20i). Επιπλέον, η διαφοροποίησή τους επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων Νεστίνης (Nestin) και νευρο-ειδικής ενολάσης (NSE), μέσω της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (Εικόνα 20ii). Ως ενδογενής θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



Εικόνα. 20: A)Μορφολογία i)διαφοροποιημένων AF-MSCs προς νευρικά κύτταρα και ii) μη διαφοροποιημένων AF-MSCs, ως μάρτυρες.

B) PCR ανάλυση για τα γονίδια νεστίνη (nestin) και νευρο-ειδική ενολάση (NSE) σε νευρικά κύτταρα (a,b) και σε AF-MSCs (c,d).

4.6 Δια-διαφοροποίηση των AF-MSCs

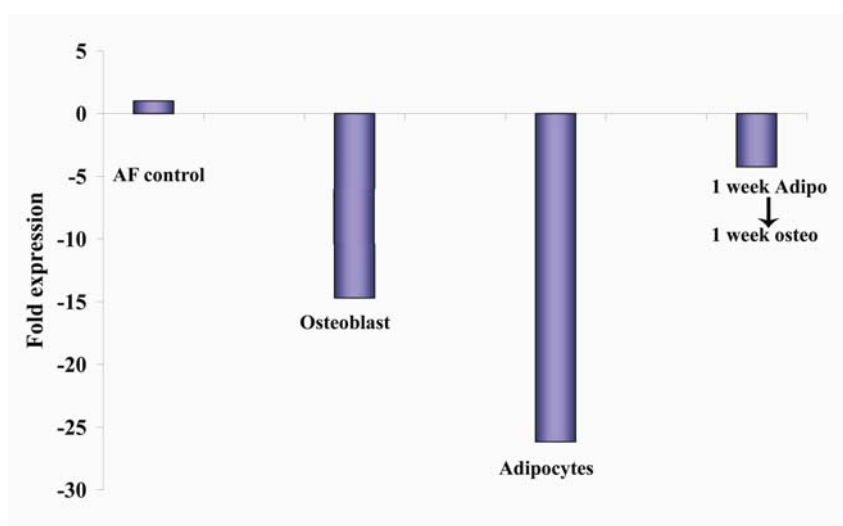
Για τη διερεύνηση της δυνατότητας δια-διαφοροποίησης των AF-MSCs πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του δείκτη ολοδυναμικότητας Oct-4 στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

Αρχικά τα AF-MSCs καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο μέσο, που προάγει τη διαφοροποίησή τους προς λιποκύτταρα για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας. Η παρουσία λιποκυττάρων διαπιστώθηκε με χρώση Oil Red O και παρατήρηση σε φωτονικό μικροσκόπιο. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του Oct-4 ήταν σαφώς μειωμένα στα διαφοροποιημένα προς λιποκύτταρα AF-MSCs, γεγονός που

υποδηλώνει την απώλεια του ολοδύναμου χαρακτήρα των κυττάρων και την απόκτηση καθορισμένου φαινοτύπου.

Έγινε κατόπιν εξέταση των επιπέδων έκφρασης του Oct-4 σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα μίας εβδομάδας που είχαν εκτεθεί σε οστεοβλαστικό μέσο καλλιέργειας για μία επιπλέον εβδομάδα. Το αποτέλεσμα απέδειξε ότι η έκφραση του δείκτη ολοδυναμικότητας είχε αυξηθεί αρκετά προσεγγίζοντας τα επίπεδα των μη διαφοροποιημένων AF-MSCs. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αποδιαφοροποίηση (dedifferentiation) των AF-MSCs προς κύτταρα προγονικού χαρακτήρα με σκοπό τη διαφοροποίηση σε επόμενο στάδιο σε οστεοβλάστες.

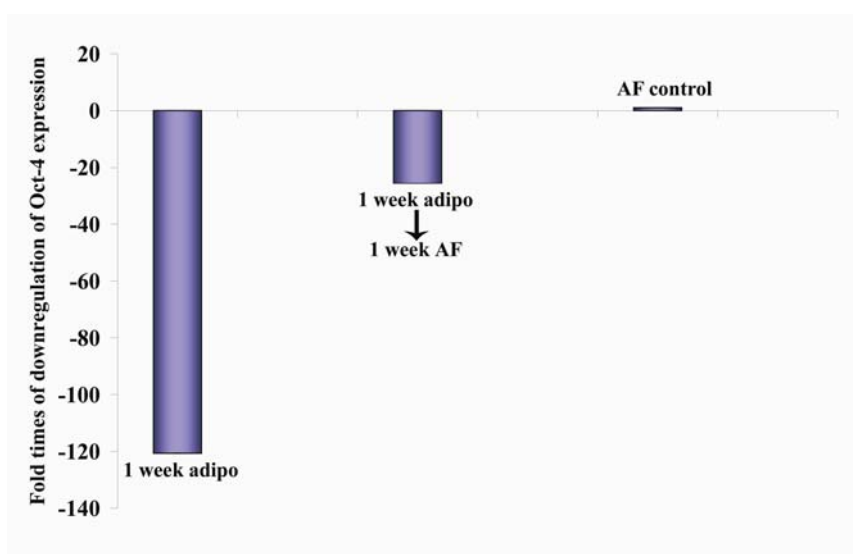
Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση του Oct-4 στα αποδιαφοροποιημένα AF-MSCs μετά από καλλιέργειά τους σε οστεοβλαστικό μέσο για χρονικό διάστημα δύο επιπλέον εβδομάδων, όπου διαπιστώθηκε η μείωση των επιπέδων έκφρασης του Oct-4 (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Επίπεδα έκφρασης του Oct-4 για μη διαφοροποιημένα AF-MSCs (AF control), οστεοβλάστες (osteoblast), λιποκύτταρα (adipocytes) και δια-διαφοροποιημένα AF-MSCs προς οστεοκύτταρα (1week adipo → 1week osteo). $Fold\ Expression = 2^{\Delta CT}$, όπου η τιμή ΔCT αντιστοιχεί στη διαφορά των PCR κύκλων ανάμεσα στο Oct-4 και στο θετικό μάρτυρα GAPDH.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το φαινόμενο της αποδιαφοροποίησης των AF-MSCs. Για αυτό το σκοπό μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 επίσης με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

Αρχικά τα AF-MSCs καλλιεργήθηκαν σε μέσο που επάγει τη διαφοροποίηση προς λιποκύτταρα για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας και παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του δείκτη ολοδυναμικότητας Oct-4 ήταν αρκετά μειωμένα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των μη διαφοροποιημένων AF-MSCs. Στη συνέχεια, τα διαφοροποιημένα προς λιποκύτταρα AF-MSCs καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο για μη διαφοροποιημένα AF-MSCs και διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του Oct-4 αυξήθηκε, επιβεβαιώνοντας την από-διαφοροποίηση των AF-MSCs και τη μετάβασή τους σε κύτταρα προγονικού χαρακτήρα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Επίπεδα έκφρασης του Oct-4 σε διαφοροποιημένα προς λιποκύτταρα AF-MSCs (1 week adipo), σε αποδιαφοροποιημένα AF-MSCs (1 week adipo → 1 week AF) και σε μη διαφοροποιημένα AF-MSCs (AF control).

Τα αποτελέσματα είναι πρώιμα, εντούτοις εκτεταμένες μελέτες συνεχίζονται τόσο για τη διερεύνηση της δια-διαφοροποίησης των λιποκυττάρων προς οστεοβλάστες και το αντίστροφο όσο και για την από-διαφοροποίηση.

5. Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και ο φαινοτυπικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού (AF-MSCs), καθώς και η μελέτη του εύρους της διαφοροποίησης και δια-διαφοροποίησής τους.

Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου κύησης, που λήφθηκαν μετά από αμνιοκέντηση για προγεννητική διάγνωση. Ο πολλαπλασιασμός των AF-MSCs πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, βασισμένο σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο καλλιέργειας, που είχε προταθεί από τον Tsai et al [62].

Η καρυοτυπική ανάλυση των δειγμάτων AF-MSCs απέδειξε ότι πρόκειται για φυσιολογικά δείγματα, ακόμα και εάν βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο έκπτυξης, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα σημαντικά για μελλοντική κλινική εφαρμογή. Επιπλέον, η μελέτη της κινητικής αύξησης των AF-MSCs απέδειξε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους ακολουθεί μία λογαριθμική αύξηση, όπου τα κύτταρα διαιρούνται με εκθετικό ρυθμό. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει τη μεγάλη ικανότητα ανάπτυξης και έκπτυξής τους.

Για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των AF-MSCs πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής ανάλυση των επιφανειακών τους αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό δεικτών. Μετά την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι ήταν θετικά για όλους τους μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως είναι τα CD90, CD105, CD73 και CD166. Επιπλέον, ήταν θετικά και για ιντεγκρίνες, όπως τα CD49e, CD49d και CD29, καθώς και για δείκτες προσκόλλησης, όπως τα CD44, CD13 και CD58. Εντούτοις, μία πιο λεπτομερής ανάλυση απέδειξε ότι ήταν αρνητικά για κάποιους ενδοθηλιακούς δείκτες, για κάποια μόρια της Ig υπεροικογένειας και για αιμοποιητικούς δείκτες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της έκφρασης των επιφανειακών δεικτών μεταξύ MSCs από αμνιακό υγρό (AF-MSCs) και από μυελό των οστών (BM-MSCs). Τα αποτελέσματα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής απέδειξαν ότι έχουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα, μετά από συγκριτική μελέτη των επιφανειακών δεικτών των AF-MSCs και των MSCs από ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCB-MSCs), όπου επίσης παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Το γεγονός αυτό καθιστά το

αμνιακό υγρό ως μία νέα πρόσφορη πηγή για την απομόνωση αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, με ενδεχόμενη χρησιμοποίησή τους στην Εμβιομηχανική των ιστών.

Η μελέτη της παρουσίας υποπληθυσμών βλαστικών κυττάρων στο αμνιακό υγρό επιβεβαιώθηκε, μετά από τη διερεύνηση της έκφρασης του δείκτη ολοδυναμικότητας Oct-4 [76]. Το Oct-4 αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, που χαρακτηρίζει την κυτταρική ολοδυναμικότητα και τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι εκφράζεται στα AF-MSCs. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μελέτη των επιπέδων έκφρασης του Oct-4 στα διαφορετικά στάδια έκπτυξης των AF-MSCs με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) και διαπιστώθηκε ότι η έκφρασή του παρέμενε σταθερή για τουλάχιστον 17 στάδια διπλασιασμού των AF-MSCs. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μετά από χρώση ανοσοφθορισμού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα διατηρούν την ολοδυναμία τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά από πολλά στάδια έκπτυξης. Κατά αυτό τον τρόπο τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του αμνιακού υγρού μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία αναγέννησης ιστών και γενικότερα στην κυτταρική θεραπεία.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του εύρους διαφοροποίησης των AF-MSCs προς κύτταρα προερχόμενα από τις τρεις γαμετικές στιβάδες(ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Για αυτό το σκοπό ακολουθήθηκαν κατάλληλα καλλιεργητικά πρωτόκολλα, ενώ ο χαρακτηρισμός των προκύπτοντων κυτταρικών τύπων έγινε σε επίπεδο RNA με τη χρήση της μεθόδου αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων. Αποδείχθηκε ότι τα AF-MSCs είχαν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, όπως είναι τα λιποκύτταρα και οι οστεοβλάστες, καθώς και σε νευρικά κύτταρα, που ανήκουν στη εξωδερμική σειρά. Αξιοσημείωτο όμως είναι το γεγονός ότι μπορούσαν να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα των οποίων η λειτουργικότητα αποδείχθηκε μετά από μελέτη της ικανότητας πρόσληψης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Κατά αυτό τον τρόπο αποδείχθηκε ότι τα AF-MSCs χαρακτηρίζονται από ευρέως φάσματος πλαστικότητα και διαθέτουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και προς τις τρεις γαμετικές σειρές.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ικανότητας δια-διαφοροποίησης των AF-MSCs. Πιο συγκεκριμένα, μετά από εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών

πρωτοκόλλων τα AF-MSCs διαφοροποιήθηκαν προς λιποκύτταρα, δηλαδή κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς. Ακολούθησε διερεύνηση της δυνατότητας δια-διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων προς οστεοβλάστες, μέσω της μελέτης της έκφρασης του δείκτη ολοδυναμικότητας Oct-4 με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Το αποτέλεσμα απέδειξε ότι είναι δυνατή η δια-διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού μεταξύ κυτταρικών σειρών της μεσοδερμικής σειράς (λιποκύτταρα και οστεοβλάστες). Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του Oct-4 ήταν σαφώς μειωμένα στα διαφοροποιημένα προς λιποκύτταρα και προς οστεοβλάστες AF-MSCs, γεγονός που υποδηλώνει την απώλεια του ολοδύναμου χαρακτήρα των κυττάρων και την απόκτηση καθορισμένου φαινοτύπου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η δια-διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού συμβαίνει μέσω από-διαφοροποίησής τους προς κύτταρα προγονικού χαρακτήρα. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη δυνητική ικανότητα των AF-MSCs να εμφανίζουν πλαστικότητα, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας για μελλοντικές κλινικές προεκτάσεις.

Συμπερασματικά, το αμνιακό υγρό, λόγω της εδραιωμένης χρήσης του στις δοκιμασίες προγεννητικής διάγνωσης, μπορεί να αποτελέσει μία νέα δυνητική πηγή για την απομόνωση πολυδύναμων εμβρυϊκών κυττάρων, χωρίς την παρουσία ηθικών ζητημάτων. Αποδείχθηκε ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του αμνιακού υγρού διατηρούν τον αρχέγονο, ολοδύναμο χαρακτήρα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των τριών γαμετικών στιβάδων (μεσόδερμα, ενδόδερμα και εξώδερμα). Η ικανότητα διαφοροποίησης και δια-διαφοροποίησης των AF-MSCs είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων στην Εμβιομηχανική των ιστών. Συνοψίζοντας, η μελέτη της βιολογίας των AF-MSCs μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νέων γνώσεων για τις δυνητικές θεραπευτικές προσπελάσεις της επιδιόρθωσης ή αντικατάστασης ιστών προκειμένου να προσδιοριστούν τα επόμενα βήματα για την αποτελεσματική θεραπευτική προσπέλαση σοβαρών εκφυλιστικών χρονίων διαταραχών.

6. Βιβλιογραφία:

1. Overturf, K., et al., Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*, 1997. 151(5): p. 1273-80.
2. Martin-Rendon, E. and S.M. Watt, Stem cell plasticity. *Br J Haematol*, 2003. 122(6): p. 877-91.
3. Fong, C.Y. and A. Bongso, Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Hum Reprod*, 1999. 14(3): p. 774-81.
4. Schuldiner, M., et al., Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(21): p. 11307-12.
5. Kirschstein, R.L. and J. Ruffin, A call to action. *Public Health Rep*, 2001. 116(6): p. 515-6.
6. Brazelton, T.R., et al., From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000. 290(5497): p. 1775-9.
7. Mezey, E., et al., Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 2000. 290(5497): p. 1779-82.
8. Krause, D.S., et al., Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001. 105(3): p. 369-77.
9. Jiang, Y., et al., Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 2002. 30(8): p. 896-904.
10. Verfaillie, C.M., Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*, 2002. 12(11): p. 502-8.
11. Fuchs, E. and J.A. Segre, Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 2000. 100(1): p. 143-55.
12. Handgretinger, R., The role of graft-versus-host disease in the inhibition of normal B-lymphopoiesis and leukemic control of B-lineage acute lymphocytic leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2006. 91(3): p. 292B.
13. Fragkos, M., et al., Use of the hereditary persistence of fetal hemoglobin 2 enhancer to increase the expression of oncoretrovirus vectors for human gamma-globin. *Gene Ther*, 2005. 12(21): p. 1591-600.
14. Makino, S., et al., Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999. 103(5): p. 697-705.
15. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004. 8(3): p. 301-16.
16. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. 16(3): p. 381-90.
17. Kadiyala, S., et al., Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 1997. 6(2): p. 125-34.
18. Johnstone, B. and J.U. Yoo, Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(367 Suppl): p. S156-62.
19. Young, R.G., et al., Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 1998. 16(4): p. 406-13.
20. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.

21. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 7): p. 1161-6.
22. Bianchi, G., et al., Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*, 2003. 287(1): p. 98-105.
23. Gronthos, S. and P.J. Simmons, The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, 1995. 85(4): p. 929-40.
24. Doi, M., A. Nagano, and Y. Nakamura, Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313(4): p. 888-93.
25. Qi, H., et al., Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): p. 3305-10.
26. Olsen, B.R., A.M. Reginato, and W. Wang, Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. 16: p. 191-220.
27. Waddington, R.J., et al., Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater*, 2003. 6: p. 12-21; discussion 21.
28. De Boer, J., H.J. Wang, and C. Van Blitterswijk, Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 2004. 10(3-4): p. 393-401.
29. Boland, G.M., et al., Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2004. 93(6): p. 1210-30.
30. Willert, K., et al., Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003. 423(6938): p. 448-52.
31. Tsonis, P.A., Regeneration in vertebrates. *Dev Biol*, 2000. 221(2): p. 273-84.
32. Zhao, L.R., et al., Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 2002. 174(1): p. 11-20.
33. Terada, N., et al., Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 542-5.
34. Song, L. and R.S. Tuan, Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J*, 2004. 18(9): p. 980-2.
35. Till, J.E. and C.E. Mc, A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 1961. 14: p. 213-22.
36. Hung, S.C., et al., Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*, 2002. 20(3): p. 249-58.
37. Rao, M.S. and M.P. Mattson, Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*, 2001. 122(7): p. 713-34.
38. Deans, R.J. and A.B. Moseley, Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 2000. 28(8): p. 875-84.
39. Kern, S., et al., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006. 24(5): p. 1294-301.
40. Bartsch, G., et al., Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*, 2005. 14(3): p. 337-48.

41. Bruder, S.P., D.J. Fink, and A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 1994. 56(3): p. 283-94.
42. Miao, Z., et al., Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 2006.
43. Wexler, S.A., et al., Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003. 121(2): p. 368-74.
44. Romanov, Y.A., V.A. Svintsitskaya, and V.N. Smirnov, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 2003. 21(1): p. 105-10.
45. Lee, K.D., et al., In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1275-84.
46. Ma, L., et al., Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*, 2005. 118(23): p. 1987-93.
47. In 't Anker, P.S., et al., Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003. 102(4): p. 1548-9.
48. McGuckin, C.P., et al., Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*, 2005. 38(4): p. 245-55.
49. Broxmeyer, H.E., et al., Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(10): p. 3828-32.
50. Lee, M.W., et al., Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 320(1): p. 273-8.
51. Panepucci, R.A., et al., Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2004. 22(7): p. 1263-78.
52. Lee, O.K., et al., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 2004. 103(5): p. 1669-75.
53. Hou, L., et al., Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol*, 2003. 78(3): p. 256-61.
54. Ma, N., et al., Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*, 2005. 66(1): p. 45-54.
55. Bieback, K., et al., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004. 22(4): p. 625-34.
56. Kang, X.Q., et al., Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int*, 2006. 30(7): p. 569-75.
57. Jeong, J.A., et al., Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells*, 2005. 23(4): p. 584-93.
58. Lanza, R.P., *Handbook of stem cells*. 2004, Amsterdam ; London: Elsevier Academic. 2 v.
59. Prusa, A.R. and M. Hengstschlager, Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit*, 2002. 8(11): p. RA253-7.
60. Gosden, C.M., Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull*, 1983. 39(4): p. 348-54.
61. Miki, T., et al., Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 2005. 23(10): p. 1549-59.

62. Tsai, M.S., et al., Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 2004. 19(6): p. 1450-6.
63. Young, H.E., et al., Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 2001. 264(1): p. 51-62.
64. Henderson, J.K., et al., Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 2002. 20(4): p. 329-37.
65. Mosquera, A., et al., Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. *J Med Genet*, 1999. 36(6): p. 494-6.
66. Mitka, M., Amniotic cells show promise for fetal tissue engineering. *Jama*, 2001. 286(17): p. 2083.
67. Frassoni, F., et al., Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood*, 2003. 102(3): p. 1138-41.
68. Noort, W.A., et al., Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 2002. 30(8): p. 870-8.
69. Chamberlain, J.R., et al., Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, 2004. 303(5661): p. 1198-201.
70. Grinnemo, K.H., et al., Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. 127(5): p. 1293-300.
71. Sugaya, K., Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol*, 2003. 228: p. 1-30.
72. Chapel, A., et al., Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*, 2003. 5(12): p. 1028-38.
73. Arinzeh, T.L., et al., Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A(10): p. 1927-35.
74. LaBarge, M.A. and H.M. Blau, Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 2002. 111(4): p. 589-601.
75. Young, H.E., et al., Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med*, 2005. 9(3): p. 753-69.
76. Jiang, Y., et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002. 418(6893): p. 41-9.