



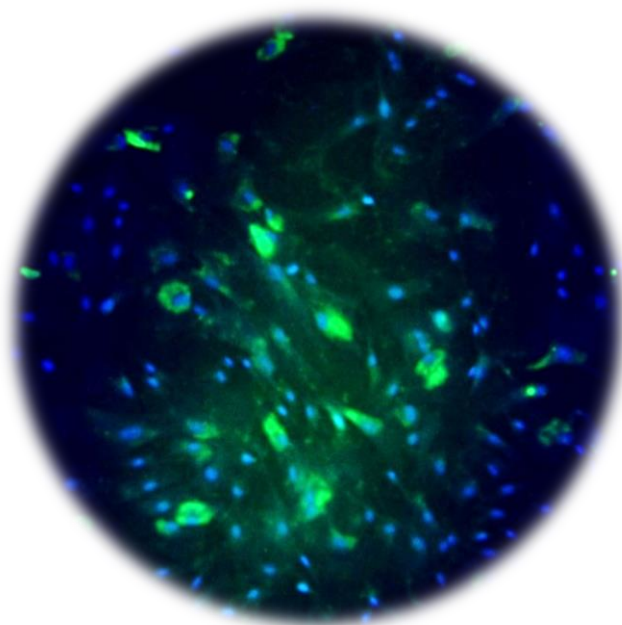
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ
ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ»**



Όνοματεπώνυμο Φοιτητή: Δήμητρα Μπούλαρη (13050)

Όνοματεπώνυμο Εισηγητή: Ευστάθιος Μιχαλόπουλος (Επιστημονικός Συνεργάτης)

Αθήνα, 2019



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF BIOMEDICAL SCIENCES

DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

BSc THESIS

**EVALUATION OF CRYOPRESERVED
MESENCHYMAL STEM CELL'S POTENCY AND
VIABILITY WITH THE USE OF DIFFERENT
CRYOPRESERVATION AGENTS**

Student: Dimitra Boulari (13050)

Supervisor: Efstathios Michalopoulos

Athens, 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (Ελ.Τ.Οπ.Α.) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διευθύντρια της Ελ.Τ.Οπ.Α., Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκίοκα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη πειραματική εργασία στα εργαστήρια της Ελ.Τ.Οπ.Α., και εξαιρετικά ευγνώμων είμαι στον Δρ. Ευστάθιο Μιχαλόπουλο για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Παναγιώτη Μαλλή για τη συνεχή καθοδήγηση και τη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας, καθώς και ένα θερμό ευχαριστώ στην κα. Έφη Παναγούλη, κα. Ζέττα Δήμου και κα. Φαίδρα Σαρρή για την υποστήριξή τους και που με έκαναν να νιώσω μέλος της ομάδας του εργαστηρίου από τη πρώτη στιγμή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου, για όλες τις θυσίες που έκανε ως γονιός, καθώς και την αδερφή μου και όλους τους αληθινούς φίλους, που στάθηκαν δίπλα μου στο ταξίδι αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα (MSCs) είναι πολυδύναμα κύτταρα που έχουν την ιδιότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα κυρίως μεσοδερμικής προέλευσης ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν σημαντικές ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Έχουν ευρύ πεδίο κλινικών εφαρμογών, κυρίως στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων παθήσεων, στη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και οργάνων αλλά και στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής. Τα MSCs βρίσκονται φυσιολογικά στον μυελό των οστών όπου δημιουργούν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον και αποτελούν το απαραίτητο υπόστρωμα για την αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs). Τα MSCs, στους ενήλικες απαντώνται σε ιστούς όπως οστά, μύες, λιπώδη ιστό, αλλά βρίσκονται και στον εμβρυικό ιστό της βαρτονεΐου γέλης του ομφάλιου λώρου. Έχει ωστόσο αποδειχθεί ότι τα MSCs που απομονώνονται από ιστούς ενήλικων οργανισμών είναι «γερασμένα» και παρουσιάζουν περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σχέση με τα MSCs προερχόμενα από εμβρυικό ιστό. Ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των MSCs είναι η παρατεταμένη καλλιέργειά τους, όπου φαίνεται πως με το πέρασμα των κυτταροκαλλιεργειών, το μήκος των τελομερών των κυττάρων μειώνεται και ίσως υπάρχει αλλαγή στις ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες που κατέχουν. Για τον παραπάνω λόγο, κρίσιμης σημασίας ήταν η μελέτη της κρυσυντήρησης των MSCs.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των κρυσυντηρημένων παραγόντων στα MSCs. Τα κύτταρα προερχόμενα από κρυσυντηρημένο ιστό βαρτονεΐου γέλης αξιολογήθηκαν με βάση την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, τη ζωτικότητα και τον φαινότυπό τους συγκριτικά με τα κύτταρα προερχόμενα από μη κρυσυντηρημένο ιστό (φρέσκο). Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των MSCs, όπως η έκφραση του αντιγόνου HLA-G, σημαντικό ανοσορρυθμιστικό παράγοντα που εκφράζουν και εκκρίνουν τα συγκεκριμένα κύτταρα. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η έκφραση των επιφανειακών δεικτών (CD's) αλλά και η ικανότητα διαφοροποίησης τους σε τουλάχιστον τρεις κυτταρικές σειρές (οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα).

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells which have the ability to self-renew and to undergo differentiation into several lineages, including those that comprise fat, bone and cartilage. In addition to their multipotency, MSCs possess unique immunomodulatory properties. Several immunosuppressive mechanisms have been described, including indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), the secretion of prostaglandin E2 and other immunosuppressive factors such as the HLA-G. It is therefore considered that MSCs could contribute in many clinical applications such as regenerative medicine, gene therapy, the treatment of severe graft versus host disease and also autoimmune diseases. MSCs can be isolated either from different adult tissues (bone marrow, adipose tissue, peripheral blood) or neonatal tissues (particular parts of the placenta and umbilical cord). Wharton's Jelly (WJ) tissue possesses an attractive source for the isolation of MSCs. However, prolonged cell culture and expansion, could affect their characteristics by causing genomic and epigenetic alterations. A possible solution to this problem would be the cryopreservation of the entire WJ tissue. In order to find the optimum method for the storage of the WJ tissue different cryopreservation methods, including vitrification and conventional cryopreservation were applied in this study. The aim of this study was to evaluate different cryopreservation methods that could be used for the long-term storage of the WJ tissue and then to evaluate the viability, the potency and the expression of HLA-G, from MSCs that possessed from cryopreserved WJ tissue. For that purpose, Wharton's Jelly isolated from the umbilical cord and cryopreserved with different cryoprotectant agents, such as Cryostor, VS55 and HMC. After 1, 2 and 4 weeks of storage, the WJ tissue was thawed and MSCs were isolated. Then, MSCs were expanded until reaching passage 8, followed by estimation of cell number, cell doubling time (CDT) and cell viability. In addition, multilineage differentiation and immunophenotypic analyses were performed. HLA-G expression in MSCs derived from vitrified samples was evaluated by immunohistochemistry, RT-PCR/PCR and immunofluorescence. MSCs derived from non-vitrified WJ tissue were used in order to validate the results obtained from the above methods. The results were positive, since MSCs were successfully obtained from vitrified WJ tissues retaining their morphological and multilineage differentiation properties. Furthermore, MSCs from vitrified WJ tissues successfully expressed HLA-G. Finally, it may be concluded that the above results indicated the successful expression of HLA-G by MSCs from vitrified WJ tissues, thus making them ideal candidates for immunomodulation.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ALP	Allkaline Phosphatase	Αλκαλική Φωσφατάση
CD	Cluster of Differentiation	Σύμπλεγμα Αντιγόνων Διαφοροποίησης
CPA	Cryoprotective Agent	Κρυοπροστατευτικά Μέσα
CRF	Controlled Rate Freezer	Καταψύκτης ελεγχόμενης ψύξης
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-διαμιδινο-2- φενυλινδόλη
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
d H2O	Demineralized Water	Απιονισμένο νερό
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNAase	Deoxyribonuclease	Δεοξυριβονουκλεάση
d NTP	deoxy-Ribonucleotides Triphosphate	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυττάρια μάζα(ή θεμέλια ουσία?)
FBS	Foetal Bovine Serum	Εμβρυικός ορός βοός
FITC	Fluresceine Isothiocyanate	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase	Αφυδρογονάση της 3- φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
GCP	Good Clinical Practice	Σωστή κλινική Πρακτική
GMP	Good Manufacturing Practice	Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική

GvHD	Graft versus Host Disease	Νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
HLA	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
hESC	human Embryonic Stem Cell	Ανθρώπινο Εμβρυικό Στελεχιαίο Κύτταρο
hiPSC	human induced Pluripotent Stem Cell	Ανθρώπινα Επαγόμενα ποικιλοδύναμα στελεχιαία κύτταρα
hMSC	human Mesenchymal Stem Cell	Ανθρώπινα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα
HSC	Haematopoietic Stem Cell	Αιμοποιητικά Στελεχιαία Κύτταρα
hSA	human Serum Albumin	Ανθρώπινος ορός αλβουμίνης
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase	Ινδολεαμίνη-2,3- διοξυγενάση
IFN-γ	Interferon γ (Gamma)	Ιντερφερόνη- γ
IIF	Intracellular Ice Formation	Ενδοκυττάριος Σχηματισμός Πάγου
IPA	Isopropyl Alcohol	Ισοπροπανόλη
ISCT	International Society for Cellular Therapy	Διεθνής Οργανισμός Κυτταρικής Θεραπείας
IVF	In vitro Fertilisation	Εξωσωματική Γονιμοποίηση
LD50	Lethal Dose 50%	
LN2	Liquid Nitrogen (N ₂)	Υγρό Άζωτο
α-MEM	Eagle's alpha Modified Minimum Essential Medium	Ελάχιστο βασικό μέσο του Eagle, α τροποποίηση

NK	Natural Killer Cells	Κύτταρα φυσικοί φονείς
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	Μονοπύρηννα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος
PBS	Phosphate Buffered Saline	Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PBMNS	Peripheral blood mononuclear cells	Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDT	Population Doubling Time	Χρόνος διπλασιασμού των (κυτταρικών) πληθυσμών
PrOH	1,2- 1,2-Propanediol	1,2 Προπανεδιόλη
Propanediol		
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNase	Ribonuclease	Ριβονουκλεάση
T cells	T Lymphocytes	T λεμφοκύτταρα
Treg	T Regulatory Cell	T Ρυθμιστικά Κύτταρα
Tg	Glass transition Temperature	Θερμοκρασία Μετατροπής υαλού
TNF-α	Tumour Necrosis Factor- α (Alpha)	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου - α
VS55	Vitrification Solution 55	Διάλυμα Υαλοποίησης 55
WJ	Wharton's Jelly	Βαρτόνειος Γέλη
Ο.Λ		Ομφάλιος Λώρος

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	v
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	2
1. Στελεχιαία Βλαστικά Κύτταρα - Ορισμός.....	2
2. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα	4
3. Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	6
1. Ορισμός Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	6
2. Μορφολογικά και Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.....	7
3. Προέλευση και Πηγές Απομόνωσης	8
4. Ιδιότητες Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	10
4.1. Φυσιολογικός ρόλος	10
4.2. Διαφοροποίηση.....	11
5. Ανοσορρυθμιστικές Ιδιότητες.....	12
6. HLA-G και Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα.....	14
6.1. Ανίχνευση και τοποθεσία του HLA-G.....	14
6.2. Ισομορφές του HLA-G που εκφράζονται στα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα ...	15
6.3. Ρόλος του HLA-G στην ανοσορύθμιση.....	17
6.4. Κλινικές εφαρμογές του HLA-G.....	18
7. Κλινικές Εφαρμογές Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων.....	19
7.1. Μεταμόσχευση και Αυτοάνοσες Παθήσεις	19
7.2. Αναγεννητική Ιατρική.....	19
7.3. Γονιδιακή Θεραπεία.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	21
8. Ιστορικά Στοιχεία	21
9. Σύγχρονοι Μέθοδοι Κρυοσυντήρησης	23
9.1. Συμβατική Αργή Ψύξη.....	23
9.2. Υαλοποίηση.....	24
10. Κρυοπροστατευτικοί Παράγοντες	25
10.1. DMSO	26
10.2. Γλυκερόλη	27
10.3. 1,2 – Προπανεδιόλη (PrOH)	27

10.4.	Άλλοι Κρυοπροστατευτικοί Παράγοντες	29
11.	Μειονεκτήματα της Κρυοσυντήρησης.....	30
11.1.	Κρύο-τραυματισμός.....	30
11.2.	Τοξικότητα των Κρυοπροστατευτικών Παραγόντων.....	31
11.3.	Απόψυξη	32
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	34
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
1.	Εξοπλισμός.....	37
2.	Παρασκευή Γενικών Διαλυμάτων.....	38
2.1.	Διάλυμα PBS 1x.....	38
2.2.	Θρεπτικό Μέσο	38
2.3.	Alicots.....	39
3.	Παρασκευή Διαλυμάτων Υαλοποίησης.....	39
3.1.	HMC.....	39
3.2.	Vitrification Solution 55 (VS55)	40
4.	Ιστολογικός Έλεγχος Δειγμάτων	41
4.1.	Μονιμοποίηση Δειγμάτων.....	41
4.2.	Αυτοματοποιημένη Ιστολογική Τεχνική	41
4.3.	Τομές Παραφίνης και Αποπαραφίνωση	42
4.4.	Προετοιμασία Τομών για Ιστολογική χρήση	42
5.	Μικροσκόπηση, Επεξεργασία Εικόνων, Στατιστική Ανάλυση	43
5.1.	Μικροσκόπηση Δειγμάτων	43
5.2.	Επεξεργασία εικόνων.....	43
5.3.	Στατιστική Ανάλυση	43
6.	Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων από Ομφάλιο Λώρο 44	
6.1.	Υλικά και Διαλύματα	44
6.2.	Διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων 44	
7.	Πλύσιμο Καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων.....	45
7.1.	Υλικά και Διαλύματα	45
7.2.	Διαδικασία Πλυσίματος Καλλιέργειας.....	45
8.	Ανακαλλιέργεια Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων	46
8.1.	Υλικά και Διαλύματα	46
8.2.	Αποκόλληση Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων και ανακαλλιέργεια.....	46
9.	Κρυοσυντήρηση Βαρτονείου Γέλης Ομφαλίου Λώρου	47

9.1.	Υλικά και Διαλύματα	47
9.2.	Διαδικασία Κρυοσυντήρησης	47
10.	Απόψυξη Βαρτονείου Γέλης και Καλλιέργεια Ιστοτεχειών	48
10.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	48
10.2.	Διαδικασία Απόψυξης και Καλλιέργειας.....	48
11.	Λειτουργικός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων.....	49
11.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	49
11.2.	Μέτρηση Αριθμού κυττάρων.....	49
12.	Ρυθμός Πολλαπλασιασμού Κυττάρων.....	50
13.	Ανοσοφαινοτυπικός Χαρτηρισμός Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	50
13.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	50
13.2.	Προσδιορισμός Επιφανειακών Δεικτών - Κυτταρομετρία Ροής.....	51
14.	Διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	52
14.1.	Οστεογενής Διαφοροποίηση	52
14.2.	Λιπογενής Διαφοροποίηση.....	53
14.3.	Χονδρογενής Διαφοροποίηση	54
15.	Ιστολογικές Χρώσεις	55
15.1.	Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη	56
15.2.	Sirius Red.....	57
15.3.	Χρώση Διαφοροποίησης Οστεοκυττάρων.....	58
15.4.	Χρώση Διαφοροποίησης Λιποκυττάρων	59
15.5.	Χρώση Διαφοροποίησης Χονδροκυττάρων.....	60
16.	Ανοσοϊστοχημεία	62
16.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	62
16.2.	Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας.....	62
17.	Μοριακός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	63
17.1.	Εξαγωγή m-RNA	63
17.2.	Σύνθεση cDNA – RT-PCR	64
17.3.	PCR	65
17.4.	Ηλεκτροφόρηση.....	69
17.5.	Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης	69
18.	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός	70
18.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	70
18.2.	Πρωτόκολλο.....	70
19.	Κυτταρομετρικός έλεγχος έναντι HLA-G	71

19.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	71
19.2.	Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας.....	71
20.	Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση (MLR).....	72
20.1.	Υλικά και Διαλύματα.....	72
20.2.	Πρωτόκολλο MLR.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		75
1.	Απομόνωση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	75
1.1.	Μορφολογία MSCs.....	75
2.	Ρυθμός Πολλαπλασιασμού και Ζωτικότητα Κυττάρων	79
3.	Ρυθμός Πολλαπλασιασμού MSCs.....	81
4.	Ιστολογική Ανάλυση.....	83
4.1.	Αιματοξυλίνη- Ηωσίνη (H&E).....	83
4.2.	Sirius Red.....	85
5.	Προσδιορισμός Επιφανειακών Δεικτών - Ανοσοφαινότυπος	86
6.	Ελεγχόμενη <i>in vitro</i> Διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων.....	88
6.1.	Οστεοκύτταρα	88
6.2.	Λιποκύτταρα	88
6.3.	Χονδροκύτταρα	89
7.	Μοριακός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων	90
8.	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός	91
9.	Ανοσοϊστοχημεία	93
10.	Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση (MLR).....	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		97
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		104

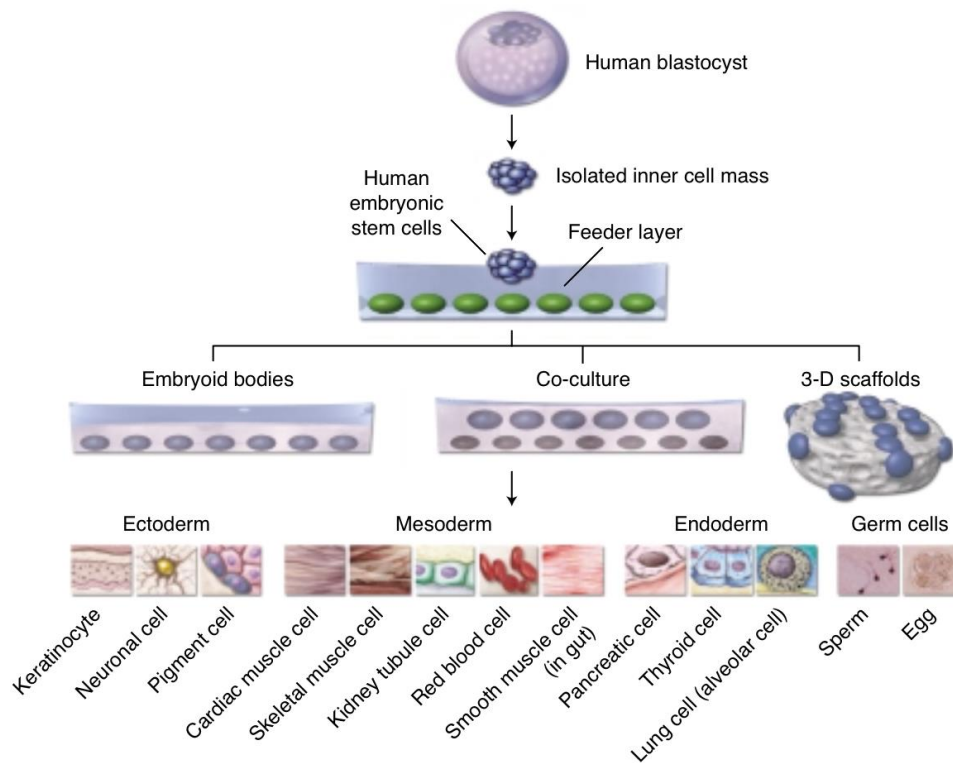
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1. Στελεχιαία Βλαστικά Κύτταρα - Ορισμός

Τα στελεχιαία βλαστικά κύτταρα αποτελούν μια κατηγορία κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης σε άλλους τύπους ώριμων θυγατρικών κυττάρων. Η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε άλλους τύπους κυτταρικών σειρών στηρίζεται στην δυναμικότητα που διαθέτουν τα συγκεκριμένα κύτταρα. Ωστόσο η δυναμικότητα αυτή μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού. Η κατηγοριοποίηση των βλαστικών κυττάρων γίνεται κυρίως με βάση την μεταγραφή και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που αφορούν την πλαστικότητα των στελεχιαίων κυττάρων, και ως εκ τούτου τη δυναμικότητα της διαφοροποίησης που τα χαρακτηρίζει. Συγκεκριμένα, η επικρατούσα ονοματολογία των βλαστικών κυττάρων όπως έχει δημοσιευθεί από τον Smith [1] είναι: τα ολοδύναμα (*totipotent stem cells*), πλειοδύναμα (*pluripotent stem cells*), πολυδύναμα (*multipotent stem cells*), ολιγοδύναμα (*oligopotent stem cells*), μονοδύναμα (*unipotent stem cells*), πρόδρομα ή προγονικά κύτταρα (*precursor or progenitor cells*).

Τα ολοδύναμα κύτταρα (*totipotent cells*), διαθέτουν την ύψιστη πλαστικότητα, υπάρχουν μόνο για ένα μικρό χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης και της δημιουργίας της βλαστοκύστης. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν την δυναμικότητα να μεταβούν σε οποιαδήποτε άλλη κυτταρική σειρά, αλλά και σε έξω-εμβρυικό ιστό όπως είναι το χόριο, ο πλακούντας και λεκιθικός σάκος. Τα πλειοδύναμα κύτταρα (*pluripotent cells*) από την άλλη πλευρά, έχουν χάσει την ιδιότητα δημιουργίας του έξω-εμβρυικού ιστού, αλλά διαθέτουν ακόμα την ικανότητα να δημιουργήσουν «βλαστικά δέρματα» το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα, αλλά όχι το τροφοεξώδερμα. Παράδειγμα πλειούναμων κυττάρων είναι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (*Embryonic Stem Cells- hESCs*) οπού απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης. Τα πολυδύναμα κύτταρα (*multipotent*) διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς πληθυσμούς περιορισμένα ως προς την εμβρυική στοιβάδα και μπορούν να απομονωθούν και από εμβρυικά αλλά και από ενήλικες πηγές. Παράδειγμα πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων αποτελούν τα Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (*Haematopoietic Stem Cells-HSCs*), τα οποία μπορούν να απομονωθούν από τον μυελό των οστών και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα.

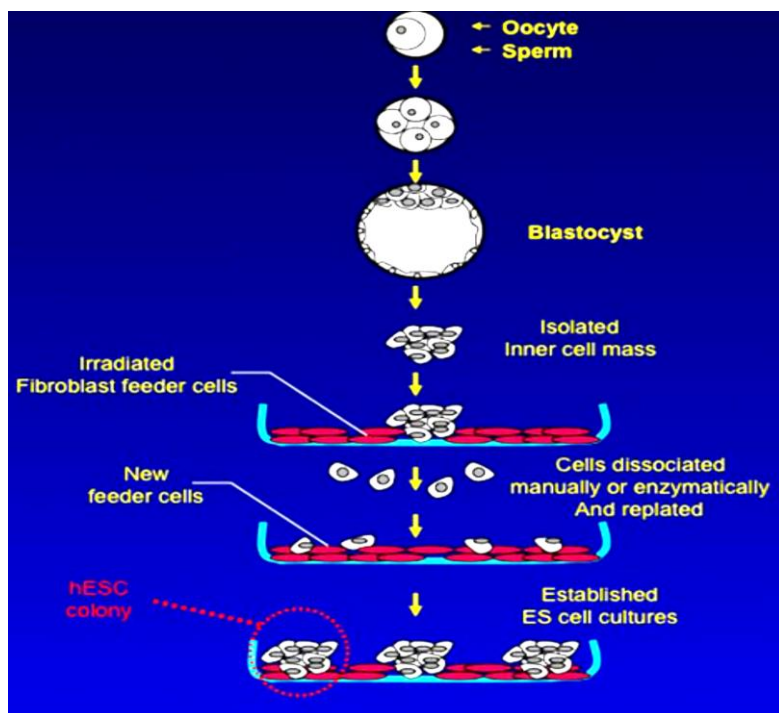


Εικόνα I-1: Προέλευση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, και διαφοροποίηση σε κατηγορίες κυττάρων

Τα στελεχειαία βλαστικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται επίσης με βάση τη προέλευσή τους, στα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (hESC) και τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα [2]. Παρόλα αυτά, υπάρχει και μια τρίτη ομάδα βλαστικών κυττάρων τα επαγόμενα πλειοδύναμα στελεχειαία κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells-iPSCs), οπού καθιερώθηκαν από τους Takahashi και Yamanaka το 2006 [3]. Τα iPSCs δημιουργήθηκαν από σωματικά κύτταρα οπού τους εισάχθηκαν τέσσερα γονίδια εκφράζοντας μεταγραφικούς παράγοντες (Oct-4, Sox2, cMyc, και Klf4) και αυτό προκάλεσε στα κύτταρα να γίνουν ουσιαστικά ταυτόσημα με τα hESC. Αυτοί οι τρεις τύποι βλαστικών κυττάρων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε τουλάχιστον 200 κυτταρικές σειρές στο ανθρώπινο σώμα [4] , με τα προγονικά κύτταρα να βοηθούν στην αναγέννηση και την επανόρθωση των ιστών του σώματος. Η κρυσυντήρηση αυτών των κυττάρων είναι ακόμα υπανάπτυκτη, με την έρευνα και την κατανόηση του συγκεκριμένου τομέα της κρυοβιολογίας να είναι αναγκαία για να επιτευχθεί η σωστή κρυοπροστασία των κυττάρων αυτών [5,6].

2. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα

Τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (hESC) είναι πλειοδύναμα κύτταρα (*pluripotent*), και όχι ολοδύναμα (*totipotent*), διότι έχουν χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης σε εξω-εμβρυικούς ιστούς. Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα δημιουργούν τις 3 στοιβάδες όπως δείχνει η εικόνα I-1 [7, 8]. Τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά από βλαστοκύστη που δόθηκε για δωρεά το 1998 σε μία



ερευνητική ομάδα στο Ουισκόνσιν των ΗΠΑ με επικεφαλής τον James Thomson. Η δημοσίευσή τους το 1998 [9] αναφέρει πως απομονώσανε επιτυχημένα 5 φυσιολογικές σειρές. Τα hESC εκφράζουν διάφορους δείκτες όπως SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 και αλκαλική φωσφατάση, επιπροσθέτως εκφράζουν OCT3/4, SOX2, KLF4 και C-MYC [3]

Εικόνα I-2: Η διαδικασία της παραγωγής των hESC

3. Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από ώριμο ιστό ενήλικων οργανισμών σε αντίθεση με τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης [11].

Η πλειοψηφία των θεραπειών που γίνεται χρήση βλαστικών κυττάρων είναι αλλογενή, όπου σημαίνει ότι τα κύτταρα προέρχονται από διαφορετικό άτομο-δότη και χορηγούνται σε ασθενή-δέκτη [12]. Οι αλλογενείς θεραπείες διαφέρουν από τις αυτόλογες στο ότι τα κύτταρα που εξάγονται από τον ίδιο τον ασθενή μεταφέρονται απευθείας στο σημείο όπου υπάρχει η ανάγκη για μεταμόσχευση ή καλλιεργούνται για την αύξηση του

αριθμού τους, πριν την χορήγησή τους. Οι αλλογενής θεραπείες συνήθως αναπτύσσονται μακριά από τον ασθενή και επεξεργάζονται σε τράπεζες κυττάρων όπου σημαίνει ότι πρέπει να μεταφερθούν. Εδώ παίζει ρόλο η κρυοσυντήρηση διότι για τις κυτταρικές θεραπείες είναι αναγκαία η μεγάλη ποσότητα κυττάρων το οποίο σημαίνει ότι η ζωτικότητα τους δεν πρέπει να πέφτει κάτω από το 90% [13]. Υπάρχουν αρκετά είδη ενήλικων βλαστικών κυττάρων όπως τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, ενδοθηλιακά βλαστικά κύτταρα, οσφρητικά βλαστικά κύτταρα, αλλά οι δύο κατηγορίες όπου είναι πιο ενδιαφέρον ερευνητικά και κλινικά είναι τα Αρχέγονα Αιμοποιητικά κύτταρα (*HSC*) και στα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία κύτταρα (*MSCs*) [11].

Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (*HSC*) είναι το προγονικό κύτταρο όλων των κυττάρων του αίματος. Τα *HSCs* μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προγονικές σειρές κυττάρων όπου τελικό αποτέλεσμα θα δώσουν ώριμα κύτταρα έτοιμα να εισαχθούν στην κυκλοφορία του αίματος, όπως ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα. Η κλινική τους χρησιμότητα είναι στην θεραπεία καρκίνων του μυελού των οστών όπως οι λευχαιμίες ή πολλαπλό μυέλωμα. Ο κλασικός δείκτης των *HSCs* είναι το *CD34* [14]. Η κρυοσυντήρηση αυτών των κυττάρων γίνεται συνήθως με τη χρήση *DMSO* σε διάλυμα όπου περιέχει αλβουμίνη [15, 16]. Οι *Abbruzzese et al* βρήκαν ότι η κρυοσυντήρηση δεν επηρεάζει τη ζωτικότητα των κυττάρων κατά τη απόψυξη, ακόμα και μετά από 10 χρόνια, και η αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης δεν μεταβάλλεται [15].

Τα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα (*Mesenchymal Stem Cells-*MSCs**), είναι ακόμα μια ομάδα κυττάρων όπου απομονώνονται από εμβρυικό αλλά και από ενήλικο ιστό, και τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνουν μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα λόγω των ιδιοτήτων τους και τις κλινικές τους εφαρμογές. Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα χαρακτηριστικά τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

1. Ορισμός Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

Η ύπαρξη μη αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων προτάθηκε από τον Cohnheim το 1867 [17]. Ο ίδιος υποστήριζε ότι ο μυελός των οστών μπορεί να είναι πηγή ινοβλαστών με ίνες κολλαγόνου, όπου είναι μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας της επούλωσης των τραυμάτων [18].

Το 1974 ο Friedenstein και οι συνεργάτες του επιτύγχαναν για πρώτη φορά την απομόνωση των Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων (MSCs) από το μυελό των οστών. Παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που είχαν κολλήσει στην επιφάνεια της καλλιεργητικής πλάκας, είχαν ετερογενή εμφάνιση και τα περισσότερα από αυτά είχαν ατρακτοειδή μορφή και δημιουργούσαν εστίες από 2 έως 4 κύτταρα, όπου παρέμεναν ανενεργά από 2 έως 4 μέρες και μετέπειτα αναπτύσσονταν ραγδαία. Ωστόσο τα κύτταρα που δεν είχαν κολλήσει στην καλλιεργητική επιφάνεια ήταν HSCs, όπου απομακρύνθηκαν 4 ώρες μετά τη καλλιέργεια σε πλαστικές επιφάνειες.

Επίσης απέδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν σε αποικίες όμοιες με οστό και χόνδρο. Επιπλέον μελέτες πήγαν ένα βήμα παραπέρα τις παρατηρήσεις του Friedenstein και απέδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα είναι πολυδύναμα και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, ακόμη και σε μυοκύτταρα [19]. Επί του παρόντος αναφέρονται ως Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα ή Πολυδύναμα Προγονικά Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα. [19]

Στη δεκαετία του 90' ο Caplan έκανε διάσημη την ορολογία Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα (*Mesenchymal Stem Cells, MSCs*). [20]

Η διεθνής εταιρία κυτταρικών θεραπειών (International Society for Cellular Therapy- ISCT) πρότεινε κάποια κριτήρια όπου πρέπει να πληρούν τα MSCs. Πρώτων, τα MSCs πρέπει να προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες όταν καλλιεργούνται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό και επώαση σε επωαστικό κλίβανο- 37°C, 5% CO₂). Δεύτερον, πρέπει να εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας όπως CD105, CD73 και CD90 αλλά να μην εκφράζουν τα CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR. Τρίτων, πρέπει να διαφοροποιούνται σε «οστεοκύτταρα», «λιποκύτταρα»

και «χονδροκύτταρα» *in vitro*. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε ακόμη περισσότερες κυτταρικές σειρές όπως μυοκύτταρα, ινοβλαστικά κύτταρα στους τένοντες και κύτταρα συνδέσμων [21,22].

Τα MSCs ανευρίσκονται σε διάφορα σημεία του σώματος, όπως ο μυελός των οστών, γύρω από τις αρτηρίες, στο λίπος, στο δέρμα, στους μύες, στα δόντια κ.ά. [21,23]. Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η αντίληψη ότι τα MSCs διαφοροποιούντουσαν σε ώριμους φαινοτύπους ποικίλων κυττάρων αλλά έχει αποδειχθεί ότι χονδροκύτταρα (με καταγωγή από MSCs) είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα και να αλλάξουν το φαινότυπο τους σε οστεοκύτταρα. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν την πλαστικότητα που διαθέτουν τα MSCs [24,25]. Ο όρος πλαστικότητα αναφέρεται στην ικανότητα των στελεχειαίων κυττάρων, που προέρχονται από έναν ενήλικο ιστό, να διαφοροποιούνται σε ένα διαφοροποιημένο κυτταρικό τύπο από έναν άλλον ιστό. Αυτή η διαδικασία αναφέρεται ως ‘ανορθόδοξη διαφοροποίηση’ ή ως ‘τρανς-διαφοροποίηση’ [26,27]. Η διαφοροποίηση των MSCs σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα μπορεί να αυξηθεί σημαντικά αν χρησιμοποιηθούν διάφοροι συνδυασμοί διαφοροποίησης [21,35].

2. Μορφολογικά και Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

Τα MSCs είναι πολυδύναμα κύτταρα, μεσοδερμικής προέλευσης, τα οποία έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε τουλάχιστον τρία είδη κυττάρων: «λιποκύτταρα» (*adipocytes*), «οστεοκύτταρα» (*osteocytes*) και «χονδροκύτταρα» (*chondrocytes*). Χαρακτηρίζονται ως μη-αιμοποιητικά κύτταρα, αλλά έχουν σημαντικούς ρόλους στην αιμοποίηση. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να απομονωθούν από διάφορους ιστούς, έχουν χαρακτηριστική μορφολογία ινοβλάστη και υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα *in vitro*. [28]

Παρά το γεγονός ότι τα MSCs μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς, παρουσιάζουν παρόμοια βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά. Λόγω του αυξημένου κλινικού ενδιαφέροντος για τα MSCs, το 2006, η Διεθνής Εταιρεία Κυτταρικών Θεραπειών [29] πρότεινε τα ελάχιστα κριτήρια, για τον καθορισμό των ανθρώπινων μεσεγχυματικών στελεχειαίων κυττάρων. Τα κριτήρια αυτά είναι:

- Η προσκόλληση σε πλαστική επιφάνεια
- Η έκφραση ειδικών αντιγόνων επιφανείας
- Το πολυδύναμο δυναμικό διαφοροποίησης

Αρχικά, τα MSCs θα πρέπει να διαθέτουν την ικανότητα προσκόλλησης στην πλαστική επιφάνεια των φιαλών κυτταροκαλλιέργειας, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας (37°C - 5% CO₂). Αυτή η βασική τους ιδιότητα, καθιστά την απομόνωση και τη καλλιέργειά τους ευκολότερη, αφού μπορούν να διαχωριστούν από τα υπόλοιπα κύτταρα ενός ιστού όπου δεν προσκολλώνται και απομακρύνονται.

Επιπλέον, πάνω από το 95% του πληθυσμού των κυττάρων θα πρέπει να εκφράζει τους αντιγονικούς δείκτες CD105 (ενδογλίνη), CD73 (εξω-5'-νουκλεοτιδάση) και CD90 (thy1) (κυτταρομετρία ροής). Επιπρόσθετα θα πρέπει να είναι αρνητικά ως προς την έκφραση ($\leq 2\%$ θετικά) του αντιγόνου της τάξης II του Ανθρώπινου Λευκοκυτταρικού Αντιγόνου (*Human Leukocyte Antigen* – HLA) HLA - DR και των CD45, CD34, CD14 ή CD11b, CD79a ή CD19. Μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί αντιγόνα επιφανείας που να απαντώνται αποκλειστικά στα MSCs. Τα MSCs στην *in vitro* καλλιέργεια επίσης δεν εκφράζουν τους δείκτες των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως ο παράγοντας von Willebrand, E-σελεκτίνη και το CD31 [30]. Αντίθετα, εκφράζουν τα σχετιζόμενα με την προσκόλληση αντιγόνα, όπως οι ιντεγρίνες ανβ1 και ανβ2, τις υποομάδες των ιντεγρινών α4, α5 και β1, το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης *ICAM-1* και το CD44H, καθιστώντας δυνατή την προσκόλληση σε μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης εκφράζουν υποδοχείς των κυτταροκινών IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R και IL-7R [31].

Σε γονιδιακό επίπεδο στα MSCs εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες *OCT-4*, *REX-1* και *NANOG*, [32] τον πυρηνικό υποδοχέα *PPAR γ 2* [33] και το μεμβρανικό υποδοχέα για τον *Leukemia Inhibitory Factor (LIF)* [34]. Όλα αυτά τα μόρια έχουν σχέση με τη δυνατότητα διαφοροποίησης των κυττάρων και με τη διατήρηση του αριθμού των σωματικών βλαστικών κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού.

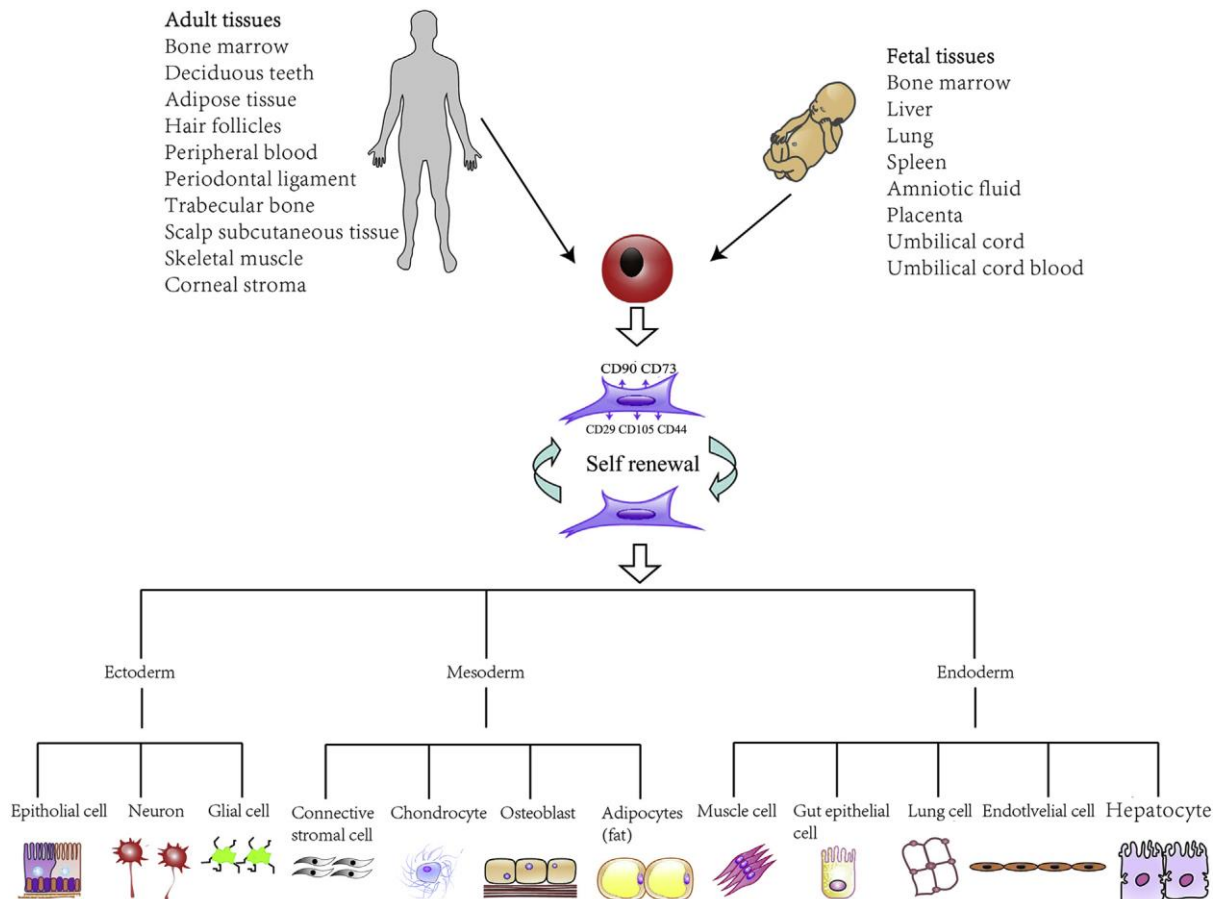
3. Προέλευση και Πηγές Απομόνωσης

Τα MSCs έχουν ποικίλες καταγωγές και διαθέτουν την ικανότητα να αναγεννούν συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους από αρκετούς ιστούς, για παράδειγμα λιπώδη ιστό,

μεμβράνη του περιόστεου, μύες, επιδερμίδα, δόντια, μυελό των οστών και ομφάλιος λώρος. Ο μυελός των οστών θεωρείται ως πηγή συγκέντρωσης πολυδύναμων κυττάρων, όπου έχουν πρόσβαση σε ποικιλία ιστών μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Εκτός από την ικανότητα της διαφοροποίησης, τα MSCs λειτουργούν ως υποστηρικτικά στρωματικά κύτταρα για την αιμοποίηση στο μυελό των οστών. Οι κυριότερες πηγές που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για την απομόνωση MSCs είναι ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός και ο ομφάλιος λώρος [36]. Η λήψη μυελού των οστών γίνεται με χειρουργείο και ο ιστός που αφαιρείται αναπληρώνεται σταδιακά από τον οργανισμό, αλλά δεν παύει να αποτελεί μία επίπονη επέμβαση, η οποία έχει έστω και λίγους κινδύνους. Η λήψη λίπους γίνεται κυρίως υποδόρια. Ο ομφάλιος λώρος λαμβάνεται κατά τον τοκετό και μέχρι να ανακαλυφθεί η χρήση του ως πηγή MSCs, απορριπτόταν. Ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δύο αρτηρίες και μια φλέβα και ο ιστός που βρίσκεται ανάμεσα και γύρω από αυτά τα αγγεία ονομάζεται Βαρτόνιος Γέλη (Wharton's Jelly) και αποτελεί μία πλούσια πηγή MSCs.

Ανάλογα με την πηγή απομόνωσης, τα MSCs μπορούν να χαρακτηριστούν εμβρυικά ή ενήλικα. Τα εμβρυικά προέρχονται από εμβρυικούς ιστούς και είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι η απομόνωσή τους δεν αποτελεί επεμβατική διαδικασία. Τα κύτταρα που απομονώνονται από εμβρυικό ιστό, έχουν αυξημένη ικανότητα διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού [37]. Εμβρυικά MSCs μπορούν να απομονωθούν πολύ εύκολα από τη βαρτόνιο γέλη του ομφαλίου λώρου. Ο χρόνος καλλιέργειάς τους είναι σύντομος και στη συνέχεια μπορούν να καταψυχθούν αποτελεσματικά σε υγρό άζωτο, ώστε να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση, διατηρώντας μετά την απόψυξη την ικανότητα καλλιέργειας, καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης σε μεσοδερμικούς κυτταρικούς πληθυσμούς.

Κάποιες διαφορές έχουν παρατηρηθεί ανάμεσα στα εμβρυικά MSCs και τα ενήλικα. Αρχικά, τα εμβρυικά απομονώνονται χωρίς επεμβατικές διαδικασίες, σε αντίθεση με τα ενήλικα, και προέρχονται από ιστούς οι οποίοι συνήθως απορρίπτονταν μετά τον τοκετό. Επιπλέον, τα εμβρυικά MSCs φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης *in vitro* και ταχύτερο χρόνο διπλασιασμού σε σχέση με τα ενήλικα, το οποίο μπορεί να οφείλεται στα μακρύτερα τελομερή τους [38]. Επιπρόσθετα, στα εμβρυικά MSCs φαίνεται να υπάρχει η έκφραση ενός ελαφρώς διαφορετικού προφίλ κυτοκινών [39,40].



Εικόνα II-1: Πηγές απομόνωσης MSCs και η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε κύτταρα εξωδερμικής, μεσοδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης [133]

4. Ιδιότητες Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

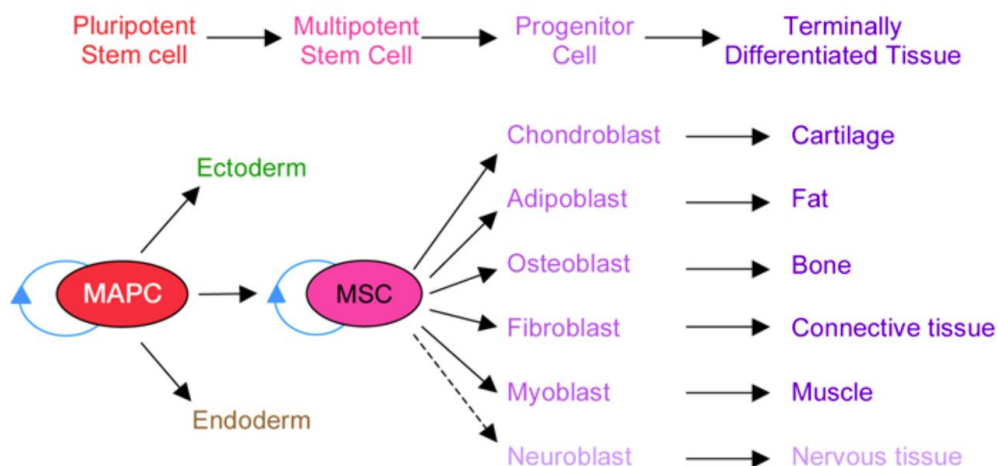
4.1. Φυσιολογικός ρόλος

Η βασική λειτουργία των MSCs στον ενήλικα ανθρώπινο οργανισμό, είναι να παρέχουν στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) το απαραίτητο μικροπεριβάλλον για την ανανέωση τους και την διαφοροποίησή τους (*hematopoietic- supporting stroma*) [41]. Τα HSCs δεν έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν χωρίς τη συνεχή διέγερσή τους. Η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από την επαφή τους με τα κύτταρα του υποστρώματος, από τα σηματοδοτικά μόρια που απελευθερώνονται από αυτά, αλλά και από τους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες, που είναι επίσης γνωστοί ως αιμοποιητικές κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες αυτές είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες παράγονται στο μυελό των οστών από τα κύτταρα του στρώματος, τα μακροφάγα, τα

ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα και ελέγχουν τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση [40]. Τα MSCs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αιμοποίηση αφού με την δημιουργία του μυελικού στρώματος ελέγχουν όλα τα στάδια αυτής της λειτουργίας και διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και σχηματίζουν όλους εκείνους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που απαιτούνται για τη δημιουργία μιας «ανθρώπινης» εστίας αιμοποίησης (*hematopoietic niche*) [42]

4.2. Διαφοροποίηση

Η πιο χαρακτηριστική βιολογική ιδιότητα των MSCs είναι η ικανότητα τους για διαφοροποίηση σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Τα MSCs κάτω από κατάλληλες συνθήκες, να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε «οστεοβλάστες», «λιποκύτταρα» και «χονδροβλάστες» *in vitro*. Επιπλέον, όμως, έχουν γίνει αναφορές για διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, ακόμα και εκτός μεσοδερμικής σειράς. Έτσι, υπάρχουν ενδείξεις για: 1) μυογονική διαφοροποίηση, η οποία μπορεί να προκληθεί από ενεργοποιημένη β-κατενίνη [43], 2) διαφοροποίηση σε καρδιακά μυϊκά κύτταρα από γενετικά τροποποιημένα MSCs, όταν μεταμοσχεύονται στο μυοκάρδιο [44], 3) *in vitro* ηπατικό δυναμικό [45] και 4) *in vitro* επαγωγή σε κύτταρα με μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων [46].



Εικόνα II-2: Η διαφοροποιητική ικανότητα των MSCs

5. Ανοσορρυθμιστικές Ιδιότητες

Τα MSCs εκφράζουν ενδιάμεσα επίπεδα των HLA τάξης I, αλλά όχι HLA τάξης II στην επιφάνεια του κυττάρου, παρόλα αυτά, χει βρεθεί έκφραση των HLA τάξης II σε ποσοστό 50% ενδοκυτταρικά [47]. Επίσης, δεν εκφράζουν το μεγαλύτερο μέρος των κλασικών συν-διεγερτικών μορίων όπως τα CD80, CD86, ή CD40. Σε πειράματα σύγχρονης καλλιέργειας, τα MSCs απέτυχαν να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό των αλλογενών λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, όταν MSCs εκτέθηκαν σε IFN- γ , περισσότερο από το 90% των MSCs εξέφραζαν HLA τάξης II. Ωστόσο, παρά την έκφραση των HLA τάξης II που προκαλείται από την διέγερση των MSCs με IFN- γ , τα MSCs δεν ήταν σε θέση να διεγείρουν τα T-λεμφοκύτταρα [47]. Επιπρόσθετα, όταν MSCs καλλιεργήθηκαν με διαφοροποιητικά μέσα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του HLA τάξης I, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν επιφανειακά HLA τάξης II [47]. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι τα MSCs δεν ενεργοποιούν αλλογενή λεμφοκύτταρα και παρουσιάζουν έλλειψη ανοσογονικότητας. Τα χαρακτηριστικά αυτά, είναι πολύ σημαντικά όσον αφορά τη δυνατότητα χρήσης τους σε θεραπευτικές εφαρμογές.

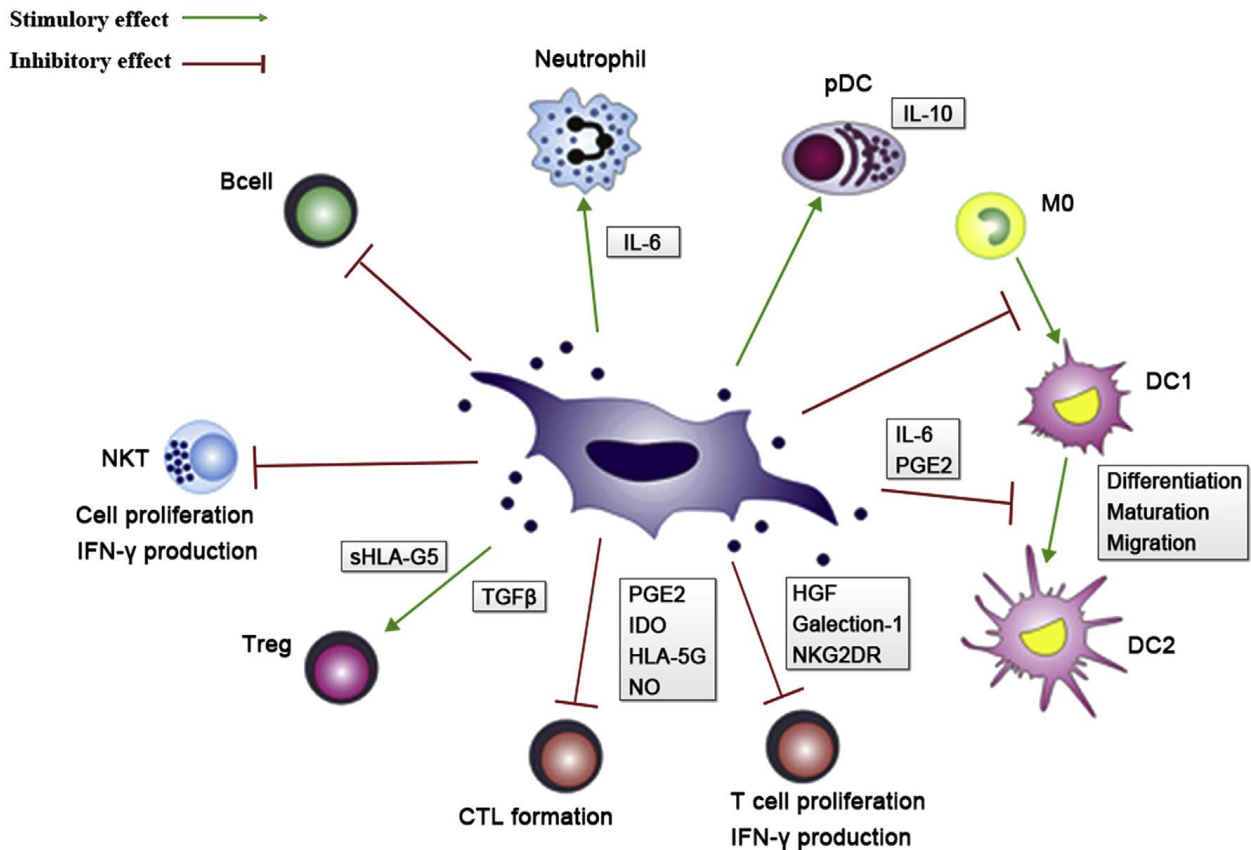
Επίσης, τα MSCs φαίνεται ότι ρυθμίζουν ορισμένες λειτουργίες των T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού τους *in vitro* και *in vivo* καθώς επίσης επηρεάζουν την έκκριση των κυτταροκινών και την κυτταροτοξικότητά τους. Παρόμοια αποτελέσματα αναστολής πολλαπλασιασμού, ασκούν και σε B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζουν την ωρίμανση και την έκκριση αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα, καθώς και την ωρίμανση, ενεργοποίηση και αντιγονοπαρουσίαση των δενδριτικών κυττάρων. Παράλληλα μειώνουν την παραγωγή κυτταροκινών και την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών κυττάρων [48]. Ακόμη μία ιδιότητα των MSCs είναι η μετανάστευση σε περιοχές τραυματισμού. Συγκεκριμένα, προωθούν τη λειτουργική ανάκτηση, αφού πρώτα έχουν προετοιμάσει το μικροπεριβάλλον του τραυματισμένου ιστού με ρύθμιση και αντιμετώπιση της φλεγμονώδους κατάστασης. Στο μικροπεριβάλλον, πολλοί παράγοντες, όπως κυτοκίνες (TNF- α , IL-1, IFN- γ), τοξίνες και η υποξία, διεγείρουν την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων από τα MSCs, οι οποίοι με τη σειρά τους συμβάλλουν στη προώθηση της ανάπτυξης των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των προγονικών κυττάρων του ιστού, τα οποία διεξάγουν την αναγέννηση και επισκευή αυτού [49]. Η ικανότητα των MSCs να ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα αρχικά

αναγνωρίστηκε όταν παρατηρήθηκε ότι αποφεύγουν την ανοσοεπαφή κατά την μεταμόσχευση των κυττάρων [50]. Αυτή τους η ικανότητα άρχισε να εφαρμόζεται για θεραπευτικούς σκοπούς σε διάφορες κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση της νόσου μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD) [51].

Έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs μπορούν να καταστείλουν αρκετές δραστηριότητες των T – λεμφοκυττάρων *in vitro* και *in vivo* [52, 53]. Συγκεκριμένα, παρθένα Τα - λεμφοκύτταρα αλλά και κύτταρα μνήμης υπόκεινται στην καταστολή όπου τους ασκούν τα MSCs και η ανασταλτική αυτή δράση των MSCs χωρίς να χρειάζεται η διαμεσολάβηση των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων CD4+, CD25+, FoxP3+ [54]. Επιπρόσθετα, τα MSCs μεταβάλλουν την έκκριση των κυτταροκινών των δενδριτικών κυττάρων (DCs), των παρθένων αλλά και των δραστικών T – λεμφοκυττάρων (T-helper 1 [T_H1] T-helper 2 [T_H2]), και των κυττάρων φυσικούς φονείς (NK) επάγοντας έναν φαινότυπο περισσότερο ανοσοανεκτικό και αντί-φλεγμονώδες. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs περιορίζουν την δραστηριότητα αρκετών κυττάρων του ανοσοποιητικού μέσω την έκκριση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων, και ενζυματικής δράσης. Εκτός από την πληθώρα των διαλυτών παραγόντων που εκκρίνονται από τα MSCs, η μια ακόμα σημαντική τους ιδιότητα να έρχονται σε επαφή κύτταρο με κύτταρο με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Για αυτόν τον λόγο, διάφορες μελέτες έχουν ξεκινήσει να εφαρμόζουν και τις δύο αυτές ιδιότητες των MSCs για βέλτιστα αποτελέσματα ανοσοκαταστολής [55-56].

Η ανοσορρύθμιση λόγω διαλυτών παραγόντων οφείλεται σε μια πληθώρα μορίων. Ένα από αυτά είναι η προσταγλανδίνη E2 (PGE2), ένα λιπίδιο όπου θεωρείται υπεύθυνο για την αναστολή των T λεμφοκυττάρων [32]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs παράγαν αυξημένα επίπεδα PGE2 όταν γινόταν συγκαλλιέργεια αυτών με T-λεμφοκύτταρα, ενώ όταν υπήρχε αναστολή της PGE2, περιοριζόταν η ανοσορρυθμιστική ικανότητα των MSCs [52]. Ακόμη ένας σημαντικός διαλυτός παράγοντας στην ανοσορρυθμιστική ικανότητα των MSCs είναι ο ινδολεαμίνη 2,3 δεοξυγενάση (IDO) [57]. Το IDO είναι ένζυμο όπου συμμετέχει στον καταβολισμό του βασικού αμινοξέος τρυπτοφάνη σε κινουρενίνη, το οποίο απαιτείται στον κυτταρικό κύκλο των Τα - λεμφοκυττάρων [58]. Το IDO εμπλέκεται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων μέσω των δενδριτικών κυττάρων [59]. Τα MSCs δεν εκφράζουν συστηματικά τον παράγοντα IDO αλλά μόνο αν διεγερθούν INF-γ. [60]. Επιπλέον διαλυτοί

παράγοντες που εκκρίνονται από τα MSCs και σχετίζονται με την αναστολή των T-λεμφοκυττάρων είναι οι hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor (TGF)-β1 οπύ καταστέλλουν την άλλο-απόκριση [61], καθώς και η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο G (human leukocyte antigen G- HLA-G).



Εικόνα II-3: Οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των MSCs: Μέσω της επαφής κύτταρο σε κύτταρο και μέσω της έκκρισης ανοσορυθμιστικών μορίων. Τα MSCs περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό και την λειτουργία των T λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων, των T ρυθμιστικών κυττάρων, των B λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων. [133]

6. HLA-G και Μεσεγχυματικά Στελεχειαία Κύτταρα

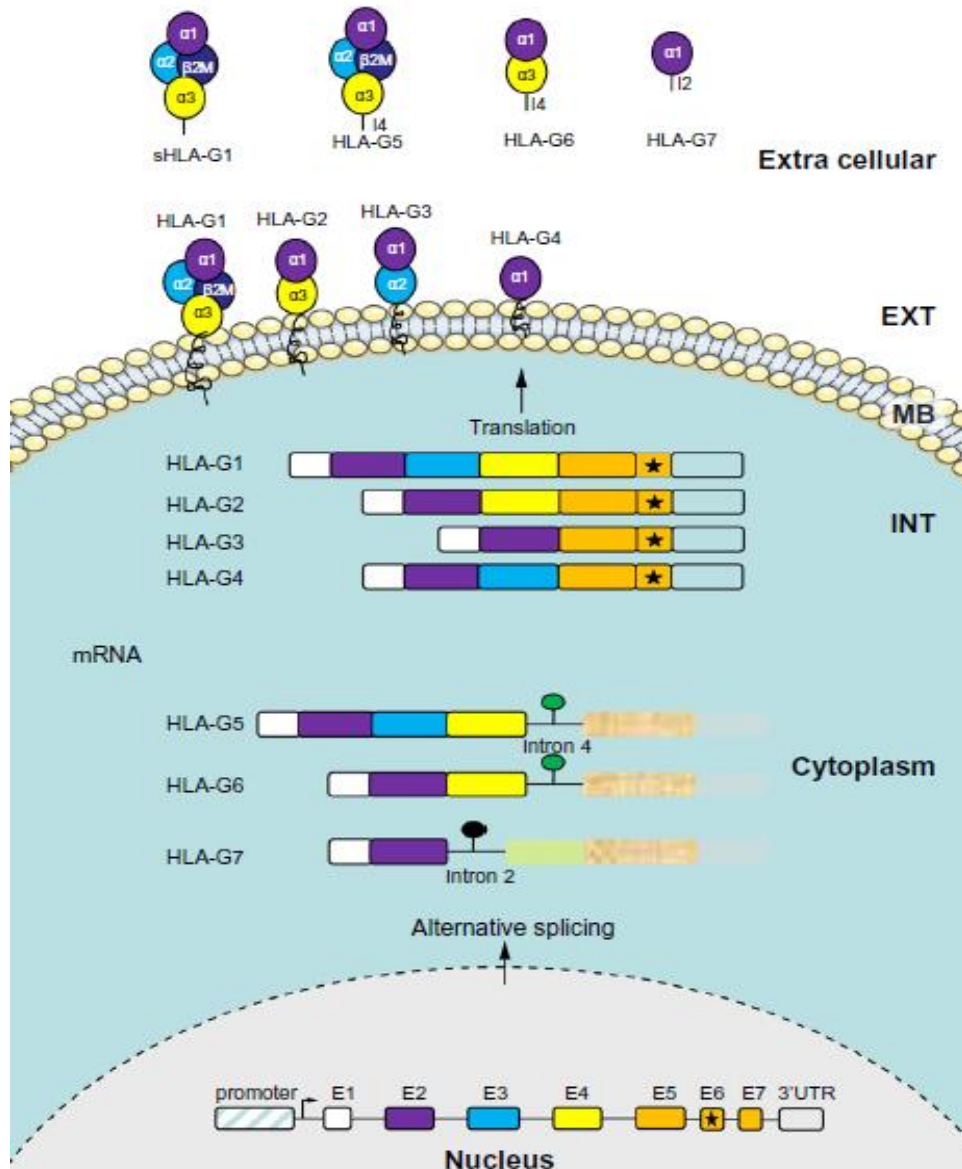
6.1. Ανίχνευση και τοποθεσία του HLA-G

Το HLA-G, αρχικά βρέθηκε στην τροφοβλάστη και χαρακτηρίστηκε ως μόριο κλειδί για την ανοσο-ανεκτικότητα μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου. Τα μόρια του HLA-G ανήκουν στα μη κλασσικά τάξης I HLA μόρια (HLA-Ib) μαζί με το HLA-E και HLA-F, σε αντίθεση με τα κλασσικά τάξης I μόρια HLA (HLA-Ia) οπύ ανήκουν τα HLA-A, HLA-B και HLA-C [62]. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 στην περιοχή p21.1-21.3. Τα μόρια του HLA-G διαφέρουν από τα κλασσικά HLA αντιγόνα λόγω μειωμένου πολυμορφισμού (50

αλληλόμορφα) και λόγω της περιορισμένης ιστικής κατανομής του. Μεταξύ άλλων, η έκφραση του HLA-G προκαλείται και σε παθολογικές καταστάσεις όπως σε όγκους και σε ιώσεις. Διάφορες έρευνες έχουν αποδείξει την παρουσία m-RNA του HLA-G και σε εμβρυικά αλλά και σε ενήλικα MSCs. Το HLA-G έχει ανιχνευθεί και στην επιφάνεια των MSCs αλλά και στο καλλιεργητικό τους υλικό [63].

6.2. Ισομορφές του HLA-G που εκφράζονται στα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα

Το HLA-G έχει 7 διαφορετικές ισομορφές, συμπεριλαμβανομένου 4 μεμβρανικές ισομορφές (HLA-G1 – G4) και 3 διαλυτές ισομορφές (HLA-G5 – G7) οπου προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα κατά τη διάρκεια του αρχικού HLA-G μεταγράφου. Η μεμβρανική ισομορφή HLA-G1 και η διαλυτή ισομορφή HLA-G5 εκφράζονται και στους ενήλικους. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι τα MSCs εκφράζουν HLA-G (κυρίως HLA-G5) και ότι εκκρίνουν HLA-G κατά τη διάρκεια αλλογενής δοκιμασίας *in vitro* [62].



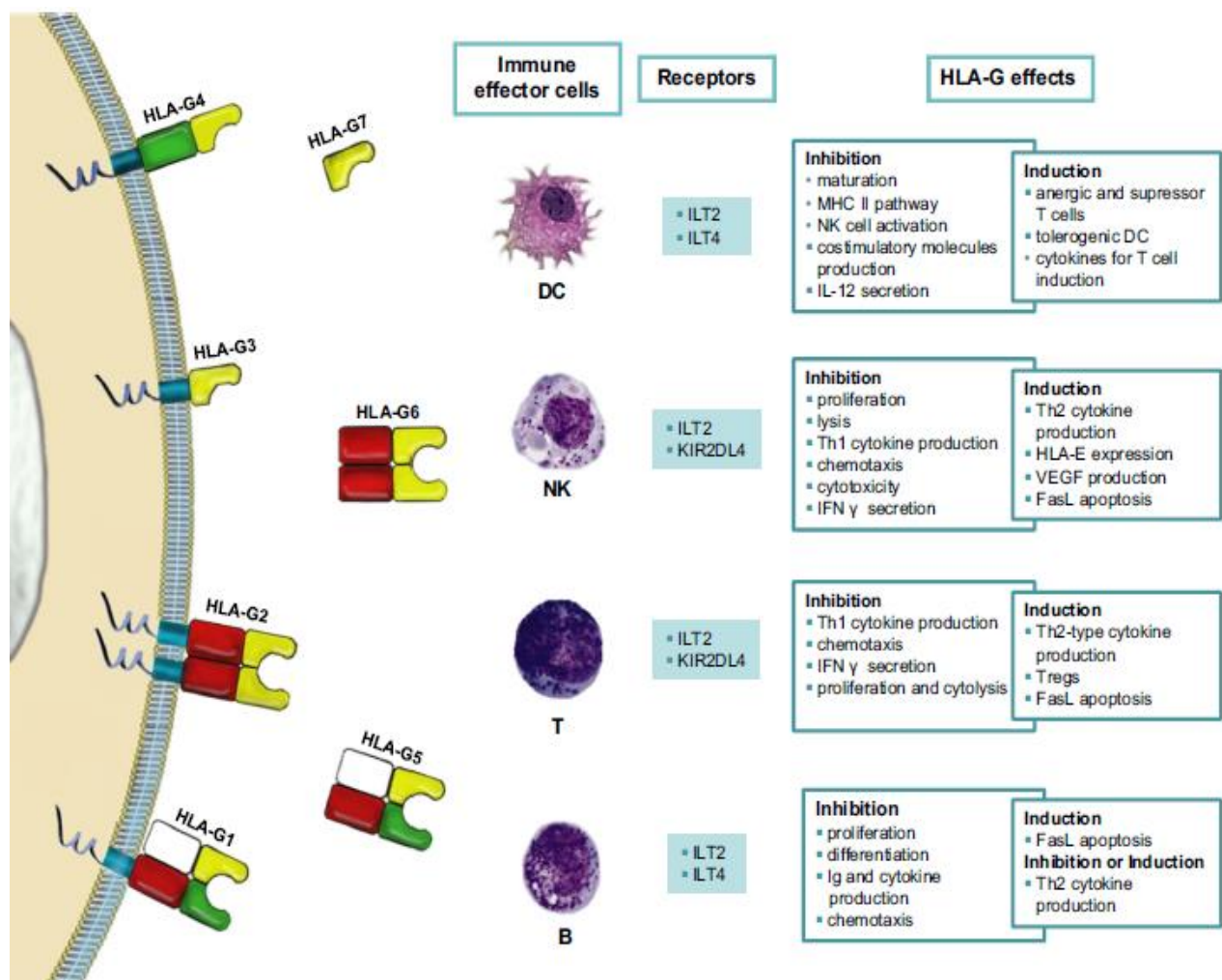
Εικόνα II-4: Το HLA-G αποτελείται από 8 εξόνια και 7 εσόνια. Το εξόνιο 1 (E1) κωδικοποιεί το πεπτίδιο σηματοδότη, το εξόνιο 7 (E7) δεν μεταγράφεται και τα εξόνια 2,3 (E2, E3) και 4 (E4) κωδικοποιούν τις περιοχές α-1, α-2 και α-3 αντίστοιχα. Το εξόνιο 5 (E5) κωδικοποιεί την διαμεμβρανική περιοχή και το εξόνιο 6 και 7 (E6, E7) κωδικοποιούν την κυτταροπλασματική περιοχή και τέλος το εξόνιο 8 (E8) αντίστοιχα την περιοχή 3'UTR. Το αστέρι (*) στο E6 και στο εσόνιο 2 και 4 αντιστοιχεί στο κωδικόνιο τερματισμού. Το αρχικό μετάγραφο από τη μεταγραφή του γονιδίου του HLA-G, υπόκειται εναλλακτικό μάτισμα, που παράγει τέσσερις ισομορφές όπου βρίσκονται σε διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές: HLA-G1,-G2.-G3,-G4 και τρεις διαλυτές ισομορφές: HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7.

6.3. Ρόλος του HLA-G στην ανοσορρύθμιση

Τα μόρια του HLA-G οπού προέρχονται από τα MSCs καταστέλλουν την αύξηση και την λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων. Επιπρόσθετα προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων CD4+, CD25+ FoxP3+ [62]. Κάποιες έρευνες έχουν δείξει μια σύνδεση του HLA-G και της IL-10, στην ενίσχυσης της ανοσοκαταστολής. Συγκεκριμένα, η IL-10 αυξάνει την έκφραση του HLA-G, και οδηγεί το HLA-G να διαφοροποιήσει τα T-λεμφοκύτταρα σε Th2. Επιπρόσθετα, το HLA-G δρα ανοσοκατασταλτικά, όταν αλληλεπιδρά με συγκεκριμένους άνοσο-υποδοχείς όπως τον υποδοχέα ILT2 (οπού κωδικοποιείται από το γονίδιο LILRB1) και τον υποδοχέα ILT4 (κωδικοποιείται από το γονίδιο LILRB2) και τέλος τον υποδοχέα (KIR)2DL4 (CD158d). Η έκφραση του ILT4 και του KIR2DL4 περιορίζεται στα κύτταρα της μυελικής σειράς και στα NK κύτταρα αντιστοίχως, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκφράζουν τον ILT2 υποδοχέα. Συμπερασματικά, τα μόρια του HLA-G μπορούν να έχουν ανασταλτικές ιδιότητες σε όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον τρόποι όπου το HLA-G ασκεί τις ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες είναι α) άμεσα προκαλώντας απόπτωση στα CD8+ T-λεμφοκύτταρα ή συλλαμβάνοντας τα T- και τα B-λεμφοκύτταρα στην φάση του κυτταρικού τους κύκλου G0/G1 ή β) έμμεσα προκαλώντας τα T- ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα ή τα άωρα δενδριτικά κύτταρα την έκφραση IL-10 [6].

6.4. Κλινικές εφαρμογές του HLA-G

Το HLA-G έχει ευρέως μελετηθεί για την χρήση του στη μεταμόσχευση αλλογενών οργάνων και έχει συσχετισθεί με την μείωση του αριθμού των επεισοδίων των ανοσολογικών απορρίψεων σε αλλογενή μετάγγιση νεφρού και ήπατος [62]. Έχει αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες από τη διαλυτή ισομορφή του HLA-G αυξάνονται δραματικά 2 ώρες μετά την χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (κυκλοσπορίνες), σε ασθενείς με μοσχέυματα καρδιάς, πράγμα που σημαίνει ότι η έκφραση του HLA-G συσχετίζεται με ανοσοκατασταλτικά μονοπάτια. Επιπρόσθετα, αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν δείξει ότι το HLA-G δρα άμεσα στην «εμφύτευση» του μοσχεύματος.



Εικόνα II-5: Σχηματική αναπαράσταση για το πως το HLA-G επηρεάζει την ανοσοεπαγρύπνιση. Τα διαλυτά και τα μεμβρανικά HLA-G μόρια ασκούν αρνητική ανοσορρυθμιστική λειτουργία αλληλοεπιδρώντας με τους υποδοχείς: KIRs, (ILT)2/CD85j/ LILR B1, ILT4/CD85d/LILRB2, και KIR2DL4/CD158d. [134]

7. Κλινικές Εφαρμογές Μεσεγγυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

7.1. Μεταμόσχευση και Αυτοάνοσες Παθήσεις

Τα MSCs μπορούν να χορηγηθούν επικουρικά στη μεταμόσχευση των HSCs, διότι όπως προαναφέρθηκε δημιουργούν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον στον μυελό των οστών. Μεγαλύτερη κλινική σημασία φαίνεται όμως, να έχουν οι ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες. Το σημαντικότερο πρόβλημα που προκύπτει μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αργέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι η εμφάνιση της νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft Versus Host Disease-GVHD). Πιο συγκεκριμένα, το GVHD αφορά την ανοσιακή προσβολή των κυττάρων του λήπτη από τα ανοσοδραστικά κύτταρα που περιέχονται στο μόσχευμα έχοντας ως αποτέλεσμα γενικευμένες σοβαρές βλάβες στους ιστούς και σε πολλές περιπτώσεις την κατάληξη του ασθενούς. Για το λόγο αυτό ο λήπτης είναι υποχρεωμένος να παίρνει ανοσοκατασταλτική αγωγή εφ' όρου ζωής καθιστώντας τον επιρρεπή σε ευκαιριακές λοιμώξεις καθώς και στην ανάπτυξη καρκίνου. Πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, όπως των Bartholomew et al το 2002 [53], απέδειξαν ότι η χορήγηση MSCs *in vivo*, θα μπορούσε να παρατείνει την επιβίωση μοσχεύματος δέρματος σε ζωικά μοντέλα, ενώ το 2004 η Le Blanc και οι συνεργάτες της χρησιμοποίησαν τα MSCs σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών όπου δεν ανταποκρινόταν σε καμία ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Η αποτελεσματικότητα στην έγχυση των MSCs στην συγκεκριμένη περίπτωση, καθιέρωσε την μέθοδο στη κλινική πρακτική [64]

Επιπρόσθετα, λόγω της ικανότητας διαμόρφωσης ανοσολογικών αποκρίσεων, τα MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί, αρχικά σε πειραματικά μοντέλα, για τη θεραπεία αυτοάνοσων παθήσεων, οι οποίες προκαλούνται από υπερβολική και λανθασμένη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι στον ίδιο τον οργανισμό. Οι κλινικές αυτές μελέτες βρίσκονται σε αρχικό στάδιο και τα αποτελέσματα είναι κυρίως η εξασθένιση της συμπτωματολογίας και η επιβράδυνση της νόσου σε ασθενείς με αυτοάνοσο διαβήτη τύπου 1 [65], ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) [66], συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) και σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) [67].

7.2. Αναγεννητική Ιατρική

Τα MSCs προωθούν την ιστική ανάπλαση και την επιβίωση κατεστραμμένων κυττάρων. Έπειτα την χορήγησή τους σε ένα οργανισμό, μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στους περισσότερους ιστούς και όργανα και όλες οι παραπάνω ιδιότητες σε συνδυασμό με την

υψηλή δυναμικότητα διαφοροποίησής τους, τα καθιστούν κατάλληλα για εφαρμογή σε αναγέννηση ιστών [53]. Τα MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί είτε άμεσα σε κυτταρική θεραπεία για την οστεοαρθρίτιδα για την επισκευή χόνδρου *in situ*, είτε έπειτα από διαφοροποίησή τους με τοποθέτηση σε ικρίωμα. Εκτός από τις κλινικές εφαρμογές σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, η μεταμόσχευση των MSCs προτάθηκε επίσης να χρησιμοποιηθεί για την επισκευή προβλημάτων του μη οστεοαρθρικού χόνδρου και σε οστά. Ακόμη, πολλές μελέτες των MSCs στοχεύουν στη θεραπεία χρόνιων δερματικών νόσων, οι οποίες προκαλούνται κυρίως λόγω διαβήτη και εγκαυμάτων. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσεων των MSCs και παράλληλα με την εξέλιξη της επιστήμης της μηχανικής ιστών (*tissue engineering*) αποτελούν καθοριστικά βήματα για την ανάπτυξη νέων τεχνικών στην αναγεννητική ιατρική [68].

7.3. Γονιδιακή Θεραπεία

Πριν από δύο περίπου δεκαετίες, έγινε δυνατή η ικανότητα μεταφοράς γονιδίων σε κύτταρα. Σε συνδυασμό με την ικανότητα των MSC να μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης, δημιούργησε πολλές ελπίδες για μεθόδους γονιδιακής θεραπείας με στόχο την πρόκληση μακρόχρονης θεραπείας χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες [69,70]. Η μεταφορά του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της IL-7 στα MSC και η τοποθέτηση αυτών σε ακτινοβολημένα ποντίκια οδήγησε σε σημαντική αύξηση στην θυμοποίηση και στην ενίσχυση της ανοσιακής λειτουργίας [71]. Σε MSC που μεταφέρθηκε το γονίδιο hHCN4 με την χρήση κάποιου λεντιού, υπήρξε επιτυχία στην ανάπτυξη κυττάρων του μυοκαρδίου *in vitro* [72]. Σε μελέτες σε τρωκτικά αποδείχτηκε ότι η χρήση MSC στα οποία είχε μεταφερθεί *ex vivo* το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων είχαν καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα στην προστασία των εγκεφαλικών ιστών από μια οξεία ισχαιμία από ότι τα MSC χωρίς την γονιδιακή μεταφορά [73]. Συμπερασματικά τα MSCs θα χρησιμεύουν ως φορείς γονιδίων, αξιοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα στόχευσής τους (*homing*) στο φυσιολογικό τους μικροπεριβάλλον. Κύτταρα από τον ιστό στόχο της θεραπείας θα μετατρέπονται *ex vivo* με το κατάλληλο γονίδιο και θα επαναχορηγούνται στον ασθενή όπου θα κατευθύνονται στο όργανο από το οποίο προήλθαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

8. Ιστορικά Στοιχεία

Οι πρώτες έρευνες στην συντήρηση ζωντανών οργανισμών ξεκινούν από το 17^ο αιώνα. Το 1663, ο Henry Power ανέφερε ότι μικρά σκουλήκια, γνωστά σήμερα ως νηματοειδή, καταψύχθηκαν σε ένα μίγμα χιονιού και αλατιού και ενώ ξεπάγωσαν τρεις ώρες αργότερα η κίνησή τους ήταν ζωντανή και ζωντανή ως συνήθως [74].

Η έρευνα της βιολογία στις χαμηλές θερμοκρασίες έχει ξεκινήσει ενεργά από το 1930. Αρχικά οι έρευνες εστίασαν στα αναπαραγωγικά κύτταρα και ειδικά στο σπέρμα. Το 1929 οι Hammond και Walton επιχείρησαν να διασταυρώσουν άγριους λαγούς και κουνέλια και για τον σκοπό αυτό, έπρεπε να διατηρήσουν το σπέρμα του λαγού σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 12°C. Παρατήρησαν ότι σε αυτή θερμοκρασία αποθήκευσης, η κινητικότητα του σπέρματος ήταν μειωμένη όταν το επαναφέρονε στις φυσιολογικές θερμοκρασίες, και έτσι επιχείρησαν την αποθήκευση τους σπέρματος στους 0°C [75]. Αφού κατέψυξαν στην θερμοκρασία των 0°C, παρατήρησαν ότι η αποθήκευση σε μειωμένη θερμοκρασία προκαλεί αύξηση της ζωτικότητας και της κινητικότητας του σπέρματος, όταν αυτό επανέλθει σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, και αυτός ήταν ο λόγος που ο Walton ασχολήθηκε με την έρευνα της κρυοκατάψυξης. [76]

Το 1937 ο Basile Luyet, ο οποίος θεωρείται ο πατέρας της σύγχρονης κρυοβιολογίας, υαλοποίησε σπερματοζωάρια βατράχων σε υγροποιημένο αέρα, με τη χρήση διαλύματος σουκρόζης. Η επαναφορά του σπέρματος ήταν επιτυχής και παρατήρησε ότι μετά την απόψυξη η κινητικότητά τους είχε διατηρηθεί.[77] Επίσης παρατήρησε ότι με τη χρήση υπερτονικού διαλύματος σουκρόζης, η επιβίωση των σπερματοζωαρίων αυξανόταν. Έτσι απέδειξε ότι η χρήση ωσμωτικού διαλύματος για την αφυδάτωση των κυττάρων, είναι απαραίτητη πριν την έκθεσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Το 1945, ο Alan Parkes ανέφερε για πρώτη φορά την επιτυχή διατήρηση ανθρώπινου σπέρματος χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο (LN₂, -196°C). Απέδειξε ότι μια πιο αργή καμπύλη κατάψυξης είναι λιγότερη επιβλαβής στα κύτταρα από ότι μια ταχεία. [78]

Ο Chris Polge στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ανακάλυψε διάφορες μεθόδους κατάψυξης διάφορων ειδών και το 1952 γεννήθηκε το πρώτο μοσχάρι από έμβρυο οπού

γονιμοποιήθηκε με κατεψυγμένο σπέρμα [79]. Το 1953, για πρώτη φορά επιτεύχθηκε η εγκυμοσύνη στο ανθρώπινο είδος, με τη χρήση κρυοκατεψυγμένου σπέρματος από τους Bunge και Sherman. Το 1956, καταγράφηκαν εννέα εγκυμοσύνες από τους 26 συνολικά ασθενείς που υποβλήθηκαν σε γονιμοποίηση από κρυοκατεψυγμένο σπέρμα. Η πρακτική αυτή πλέον εφαρμόζεται παγκοσμίως [80].

Το 1953, ο James Lovelock αναφέρει πως γλυκερόλη δρα ως κρυοπροστατευτικό μέσο (CPA), και αργότερα απέδειξε τις δράσεις δεκαπέντε διαφορετικών ενώσεων ως CPA, συμπεριλαμβανομένου την μεθανόλη, την αιθανόλη, την αιθανο-γλυκόλη, την ερυθρόλη και την σουκρόζη. Ακολούθως, απέδειξε τη πρώτη χρήση του DMSO ως κρυοπροστατευτικό μέσο το 1959 [81].

Το 1957 στο περιοδικό «Proceedings of the Royal Society B» ο Alan Parkes αναφέρει για πρώτη φορά τον όρο «Κρυοβιολογία» (*Cryobiology*) χρησιμοποιώντας την λέξη «κρύο» από την ελληνική γλώσσα [82]. Το ζήτημα που είχε το περισσότερο ενδιαφέρον στο συγκεκριμένο τεύχος ήταν από τους Jones et al, οπού ανέλυναν τους παράγοντες που επηρέαζαν τα ερυθροκύτταρα κατά την απόψυξή τους [83]. Παρατήρησαν ότι μετά από 6 μήνες αποθήκευσης με τη χρήση θρεπτικού μέσου γλυκερόλης-κιτρικών-φωσφατάσης, τα κύτταρα είχαν ποσοστό επιβίωσης 75%. Επιπρόσθετα, ερευνήσανε ένα εύρος θερμοκρασιών ψύξης και συγκεντρώσεων γλυκερόλης, και παρατήρησαν ότι τα κύτταρα αποθηκευμένα στους -20°C σε συγκέντρωση 3.0 M γλυκερόλης υπέστησαν 10% αιμόλυση. Επίσης ανέφεραν ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες η αιμόλυση ήταν δύσκολο να αποφευχθεί έτσι υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης ήταν αναγκαίες.

Τέλη δεκαετίας του 1960, όλες οι έρευνες είχαν επικεντρωθεί γύρω από τη φυσική της κρυοβιολογίας, με αποκορύφωμα το 1972 με την δημοσίευση του Peter Mazur «η υπόθεση των δυο παραγόντων» [84]. Εν συντομία, απέδειξε ότι ο πολύ υψηλός ή πολύ χαμηλός ρυθμός ψύξης είναι θανατηφόρος για τα κύτταρα λόγω του τραυματισμών που προκαλούνται από τη δημιουργία πάγου.

Οι αρχικές ουσιώδης τεχνικές που σχεδιάστηκαν από τους Hammond, Luyet και Parkes έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 40 χρόνια. Όλη τη δεκαετία του 1970 αναφορές γινόντουσαν στην επιτυχή ανάπτυξη κατεψυγμένων εμβρύων της φάσης των 2, 4 και 8

κυττάρων αλλά και στη φάση της βλαστοκύστης. Παράλληλα με αυτά τα επιτεύγματα, η επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης με την γέννηση της Louise Brown ήταν ένα γεγονός ορόσημο στην ιστορία της αναγεννητικής ιατρικής. Έπειτα από 6 χρόνια από αυτό το σημαντικό γεγονός ο Zeilmaker κατάφερε το 1984 τη πρώτη επιτυχή εγκυμοσύνη από κατεψυγμένο έμβρυο [85].

Όσο η έρευνα της κρυοβιολογίας συνεχίζεται, στόχος των επιστημόνων είναι η κρυοσυντήρηση πιο εύθραυστων και «δύσκολων» κυττάρων όπως επίσης και η αποτελεσματική τους μακροχρόνια αποθήκευση για τη χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική και στις κυτταρικές θεραπείες.

9. Σύγχρονοι Μέθοδοι Κρυοσυντήρησης

Σήμερα στην κρυοβιολογία χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικοί παράγοντες περιορίζοντας την δημιουργία κρυστάλλων. Δύο θεωρούνται οι κύριες μέθοδοι κρυοσυντήρησης πολύπλοκων δομών, η συμβατική αργή ψύξη και η υαλοποίηση [86].

9.1. Συμβατική Αργή Ψύξη

Για να αναλυθεί η συμβατική αργή ψύξη θα χρησιμοποιηθεί ένα παράδειγμα από *in vitro* κύτταρα που καταψύχθηκαν σύμφωνα με τα ευρέως αποδεχτά πρωτόκολλα.

Μετά από ενζυματική αποκόλληση των κυττάρων και επαναιώρησή τους με κρυοπροστατευτικό παράγοντα, τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου cryovials. Τα κύτταρα καταψύχονται σε προκαθορισμένο ρυθμό ψύξης. Ειδικότερα χρησιμοποιείται ισοπροπανόλη (IPA) σε ειδικά δοχεία όπου εισάγονται έπειτα τα κύτταρα [87]. Αυτή η μέθοδος επιτυγχάνει την μείωση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος όπου τα σωληνάρια με τα κύτταρα φυλάσσονται, λόγω των φυσικών ιδιοτήτων της ισοπροπανόλης. Το νερό στους -0.6°C προτιμά να μεταβαίνει σε κρυσταλλική φάση και γίνεται θερμοδυναμικά ασταθές, ελέγχοντας τον ρυθμό ψύξης στους $-1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ και για τα στελεχιαία κύτταρα, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων κατά την απόψυξη είναι ζωντανά [88]. Αυτή είναι μια σταθερή διαδικασία όπου ακολουθείται σε εργαστήρια ανά τον κόσμο, και θεωρείται το ισχύον πρότυπο για την διατήρηση ποικίλων θεραπευτικών στελεχιαίων κυττάρων [89,87,90]. Τα βήματα της συγκεκριμένης τυπικής διαδικασίας της συμβατικής αργής ψύξης, βοηθάνε στην ελαχιστοποίηση της δημιουργίας κρυστάλλων πάγου όπου έχουν σαν

αποτέλεσμα τον τραυματισμό του κυττάρου. Τα κύτταρα που διατηρούνται με αυτή τη μέθοδο είναι τα σπερματοζωάρια, τα ωάρια, και τα hESCs και συνήθως τα ποσοστά ζωτικότητας κατά της απόψυξη αγγίζουν το 90%. Αυτά ποσοστά έχουν επιτρέψει τη δημιουργία κυτταρικών τραπεζών ανά τον κόσμο, με τη δυνατότητα να μπορούν να παραδώσουν κύτταρα κυριολεκτικά «από το ράφι», όταν υπάρχει ανάγκη από κάποιον ασθενή [91,92].

9.2. Υαλοποίηση

Η υαλοποίηση διαφέρει με την αργή ψύξη στο ότι μικρές ποσότητες κυττάρων, φορτώνονται με μεγαλύτερες ποσότητες CPA απ' ό,τι στην αργή ψύξη και πάνε απευθείας στο υγρό άζωτο, έτσι αποφεύγεται η ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια δημιουργία κρυστάλλων πάγου διότι δημιουργείται μια ψευδό στερεά δομή «υαλού». Σε αυτή τη κατάσταση, το σύστημα έχει ιδιότητες ενός στερεού αλλά τα μόρια έχουν τη δομή ενός υγρού [93]. Δυστυχώς όμως, εξαιτίας της ραγδαίας ψύξης που απαιτείται ($>100^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$) μπορούν να υαλοποιούνται μόνο μικροί όγκοι κάθε φορά, συνήθως 1 έως 20 μL . Η θερμοκρασία μετάβασης υαλού (Tg) του νερού είναι -138°C και για να επιτευχθεί πραγματική υαλοποίηση του νερού ο ρυθμός ψύξης όπου απαιτείται είναι $106^{\circ}\text{C}/\text{s}$ [94,95, 96] αν και αυτό δεν έχει ακόμα εφαρμοστεί σε κύτταρα. Για να μετατραπούν επιτυχώς τα κύτταρα σε υαλοποιημένη μορφή, χρειάζεται ένας πιο μέτριος ρυθμός ψύξης, και κατά συνέπεια ο όγκος των κυττάρων που θα διατηρηθούν είναι πιο περιορισμένος, ενώ η συγκέντρωση των CPA θα αυξηθεί $\sim 4\text{M}$ συγκριτικά με την αργή ψύξη (10% DMSO είναι 1.28M). Η υψηλότερη συγκέντρωση CPA, μειώνει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου, αυξάνει το Tg τόσο ώστε η υαλοποίηση να μπορεί να πετύχει πιο εφικτούς ρυθμούς ψύξης [72,97]. Αν και η υαλοποίηση αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου, μειονεκτεί λόγω των εξαιρετικά χαμηλών όγκων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (1-20 μL). Ακόμα και σε πυκνό διάλυμα κυττάρων (πχ 10^7 κύτταρα/mL), μόνο 200,000 κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν ανά δείγμα, όπου είναι αρκετά μικρότερος αριθμός από αυτόν που απαιτείται για τις κυτταρικές θεραπείες. Παρόλα αυτά, η υαλοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως στην αναγεννητική ιατρική για τη διατήρηση ωαρίων και IVF εμβρύων, όπου ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρός.

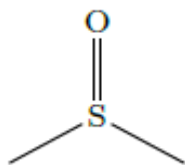
Σήμερα έχουν παρατεθεί δυο προσεγγίσεις της μεθόδου της υαλοποίησης: α) μέθοδος εξισορρόπησης και β) μέθοδος μη εξισορρόπησης με την δεύτερη τελικά να

επικρατεί περισσότερη έναντι της πρώτης. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση διαλυτών και εφαρμόζεται σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας με συγκεκριμένο ρυθμό ($\sim 10\text{ C / min}$). Στην περίπτωση της μεθόδου μη εξισορρόπησης χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικοί παράγοντες των οποίων η συγκέντρωση δεν είναι τόσο υψηλή όσο στην πρώτη περίπτωση με διαφορά ότι πραγματοποιείται ραγδαία μείωση της θερμοκρασίας. Και οι δύο τεχνικές φέρουν σημαντικά μειονεκτήματα στην πρακτική εφαρμογή τους. Το μείζον πρόβλημα που υπάρχει στην μέθοδο εξισορρόπησης είναι η προκαλούμενη τοξικότητα, η οποία οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών παραγόντων. Αντίθετα στην μέθοδο μη εξισορρόπησης η προκαλούμενη βλάβη στον ιστό ή στο όργανο οφείλεται κυρίως από την ταχεία μείωση της θερμοκρασίας, ενώ η συγκέντρωση των διαλυτών δεν προκαλεί κάποια τοξικότητα στο κρυοσυντηρημένο ιστό ή όργανο. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη πιθανότητας τοξικότητας στο υπό κρυοσυντήρηση ιστό ή όργανο φαίνεται να περιορίζει την εφαρμογή της [98].

10. Κρυοπροστατευτικοί Παράγοντες

Ένα πλήθος χημικών παραγόντων χρησιμοποιείται για την κρυοσυντήρηση κυττάρων και ιστών. Πολλές μελέτες έχουν γίνει σε διάφορα CPAs για τη διατήρηση σπέρματος και ωαρίων, όπου είναι σημαντικά στην αναπαραγωγική ιατρική αλλά παρόλα αυτά, οι αρχές που ακολουθούνται στα σωματικά κύτταρα, είναι ίδιες με αυτές των στελεχιαίων βλαστικών κυττάρων [99]. Το πιο ευρέως χρησιμοποιημένο στα εργαστήρια, κρυοπροστατευτικό μέσο είναι το DMSO, συνήθως σε διάλυμα συγκέντρωσης 10% εμπλουτισμένο με εμβρυικό βόειο ορό (FBS) [100]. Παρακάτω θα αναλυθεί η αποτελεσματικότητα του πιο διαδεδομένου κρυοπροστατευτικού μέσου, το DMSO και άλλων δυο διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών μέσων, της γλυκερόλης και της 1,2 Προπανεδιόλης αλλά και μία σύντομη αναφορά σε άλλα κρυοπροστατευτικά μέσα [101].

10.1. DMSO



Εικόνα III-1: χημική δομή DMSO

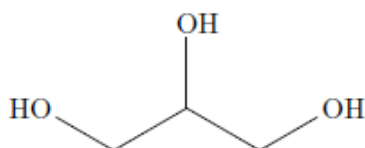
Το DMSO (Me₂SO) είναι μια ένωση οργανικού θείου. Έχει μοριακό βάρος 78.13 και σε θερμοκρασία δωματίου είναι άχρωμο υγρό. Η πυκνότητά του είναι 1.090g/cm³ και το ιξώδες του 0.001811mPa.s [102]. Χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό μέσον διάφορων κυττάρων όπως αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ωοθηκικά ωοθυλάκια ψαριών ζέβρα, CHO cells (Chinese Hamster Ovary), και αρκετές ακόμη κυτταρικές σειρές [103].

Το DMSO χρησιμοποιείται ως CPA από το 1950 [81]. Η συνιστάμενη συγκέντρωση που προτείνουν τα πρωτόκολλα είναι 10% [89,104] και πολλές έρευνες αναφέρονται σε αυτήν ως στάνταρ συγκέντρωση [105].

Το κύριο πλεονέκτημα στη χρήση του είναι η προστασία που παρέχει στα κύτταρα ελαττώνοντας τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου κατά τη ψύξη των κυττάρων. Μια μελέτη του 2000, των Baudot *et al* [106] ερευνά τον τρόπο ψύξης με τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων υδατικού διαλύματος DMSO (40-47,5%). Η έρευνα έδειξε ότι το DMSO μαζί με άλλες παρόμοιες χημικές ουσίες δημιουργούν σταθερούς υάλους, δείχνοντας ότι αποφεύγεται η δημιουργία κρυστάλλου πάγου, οπότε είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή κρυοσυντήρηση. Οι συγκεντρώσεις του DMSO είναι πολύ υψηλότερες από ότι χρησιμοποιείται συνήθως, ακόμα και υψηλότερες απ' ότι στην υαλοποίηση, η συγκεκριμένη έρευνα έδειξε τη τάση του DMSO στη δημιουργία υάλου.

Ο μηχανισμός με τον οποίον το DMSO αποτρέπει την δημιουργία κρυστάλλων πάγου έχει σαφώς μεγάλο ενδιαφέρον. Οι Mandumpal *et al* [107] χρησιμοποιώντας υπολογιστική μοριακή δυναμική προσδιόρισαν πώς το DMSO αποτρέπει την δημιουργία κρυστάλλων πάγου. Το συμπέρασμα των πειραμάτων τους ήταν πως όταν το σύστημα έχει αυξηθεί σε θερμοδυναμική σταθερότητα σε ένα σημαντικό σημείο της ψύξης έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία σταθερού υαλού και ως εκ τούτου μειώνεται η δημιουργία κρυστάλλων πάγου οπότε βοηθά στην αποτελεσματικότερη διατήρηση των κυττάρων.

10.2. Γλυκερόλη

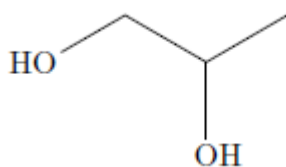


Εικόνα III-3: χημική δομή Γλυκερόλης.

Δύο εναλλακτικές επιλογές του DMSO είναι η γλυκερόλη και η 1,2 Προπανεδιόλη (PrOH) γνωστά και ως γλυκερίνη και 1,2,3 Προπανεδιόλη. Η γλυκερόλη έχει μοριακό βάρος 92.09g/Mol, ιξώδες 0.934Pa.s και πυκνότητα 1.261g/cm³. Παγώνει στους 17.8° C, δεν είναι τοξική για τον άνθρωπο, και σε θερμοκρασία και πίεση δωματίου είναι άχρωμη [108].

Η γλυκερόλη έχει πληθώρα εφαρμογών στην βιομηχανία, στην ιατρική και στην βιολογία. Όλα τα λιπίδια έχουν ως βάση την γλυκερόλη, και έτσι είναι αναγκαία για τις δομές των λιπών [109]. Χρησιμοποιείται για την κρυοσυντήρηση βακτηριδίων, εφαρμόζεται ως φυσικός μηχανισμός ψύξης από τα έντομα και τα αμφίβια. Στην βιομηχανία, χρησιμοποιείται ευρέως ως λιπαντική ουσία [110]. Στην ιατρική χρησιμοποιείται ως σιρόπι για τον βήχα. Έρευνα από τους John Morris *et all* [111] έδειξε ότι η γλυκερόλη δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το νερό, και έπειτα ανταγωνίζονται άλλα μόρια νερού διαταράσσοντας τη παραγωγή πάγου. Αυτή είναι η βασική του ιδιότητα ως κρυοπροστατευτικό μέσο, αλλά δυστυχώς οι ιδιότητες ιξώδους που κατέχει δε τη κατατάσσει καλό CPA. Το υψηλό ιξώδες περιορίζει τη διάχυση του νερού και ως εκ τούτου την απώλεια του νερού από τα κύτταρα λόγω της ώσμωσης περιορίζεται. Η απώλεια του νερού είναι σημαντική για την κρυοσυντήρηση αφού το νερό μέσα στα κύτταρα προκαλεί την δημιουργία κρυστάλλων πάγου οπού τραυματίζουν το κύτταρο ενδοκυττάρια [112].

10.3. 1,2 – Προπανεδιόλη (PrOH)



Εικόνα III-3: χημική δομή 1,2 Προπανεδιόλης

Η PrOH είναι ένα μη τοξικό, διαυγές διάλυμα (σε θερμοκρασία δωματίου) και έχει μοριακό βάρος 76.09g/Mol, Έχει ελαφρώς μικρότερη πυκνότητα και ιξώδες από τη γλυκερόλη με πυκνότητα

1.036g/cm³ και ιξώδες στα 0.0404Pa.s [113]. Το σημείο ψύξης είναι στους -60°C. Η PrOH χρησιμοποιείται ευρέως στην αναπαραγωγική ιατρική από το 1980. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη διατήρηση σπερματοζωαρίων αλλά και εμβρύων και βλαστοκύστης [114]. Έρευνα των Emiliani *et al* έδειξε ότι σε έμβρυο της φάσης 4 κυττάρων η ζωτικότητα έφτασε >80% [115]. Επιπρόσθετα εξετάστηκε η τοξικότητα της PrOH, και μετά από έκθεση 24 ωρών σε αυτή, υπήρξε μία απώλεια της τάξης 12%. Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρχικού σταδίου έμβρυα και βλαστοκύστες από ποντίκια. Αυτό δείχνει για ακόμα μία φορά την ανάγκη χρήσης ανθρώπινων κυττάρων για τη μελέτη των κρυοπροστατευτικών μέσων, λόγω της αποτελεσματικότητας του PrOH στη διατήρηση αναπαραγωγικών κυττάρων μιας και θα μπορούσε να αποδειχθεί ως εναλλακτική λύση για το DMSO.

Κρυοπροστατευτικοί παράγοντες

<u>Χαμηλού Μοριακού Βάρους</u> (MW <95 Da)	<u>Μοριακό Βάρος</u> (180 < MW < 594 Da)	<u>Υψηλού Μοριακού Βάρους</u> (MW >1000 Da)
Πολυαλκόολες	<u>Μονοσακχαρίτες:</u> Φρούκτόζη, Γλυκόζη, Λακτόζη, Μαλτόζη	Δεξτρόζη
Γλυκόλη Αιθυλενίου	<u>Δισακχαρίτες:</u> Σουκρόζη Τρεχαλόζη	Φικόλη
DMSO	<u>Πολυσακχαρίτες:</u> Ραφινόζη	Πολυβυνλική Πυρρολιδόνη
Γλυκόλη		Γλυκόλη Πολυαιθυλενίου
Γλυκερόλη Προπυλενίου		Αλκοόλη Πολυαιθυλενίου

1,2/1,3 Βουτανδιόλη		Πολυβυνλική αλκοόλη
Φορμαμίδιο, Ακεταμίδιο		Υδροξείδιο του Αμύλου

10.4. Άλλοι Κρυοπροστατευτικοί Παράγοντες

Σε μια ανασκόπηση του Barry Fuller [116] αναφέρονται διάφορα σάκχαρα και αλκοόλες οπού έχουν μελετηθεί εκτενώς για την αποτελεσματικότητά τους ως CPA σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Τα πιο αποτελεσματικά απο αυτά είναι η σουκρόζη και η αιθανοδιόλη. Από την άλλη παρατηρήθηκε χαμηλή αποτελεσματικότητα από τα αμινοξέα προλίνη, αλανίνη και γλυκίνη και από τα σάκχαρα γλυκόζη και λακτόζη αλλά και οι αμίνες όπως ακεταμίνη και φορμαμίνη. Το Υδροξυαιθυλικό άμυλο έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη συντήρηση ερυθροκυττάρων αλλά λόγω του υψηλού μοριακού του βάρους δεν είναι εφικτή η χρήση του για την διατήρηση εμπύρηνων κυττάρων.

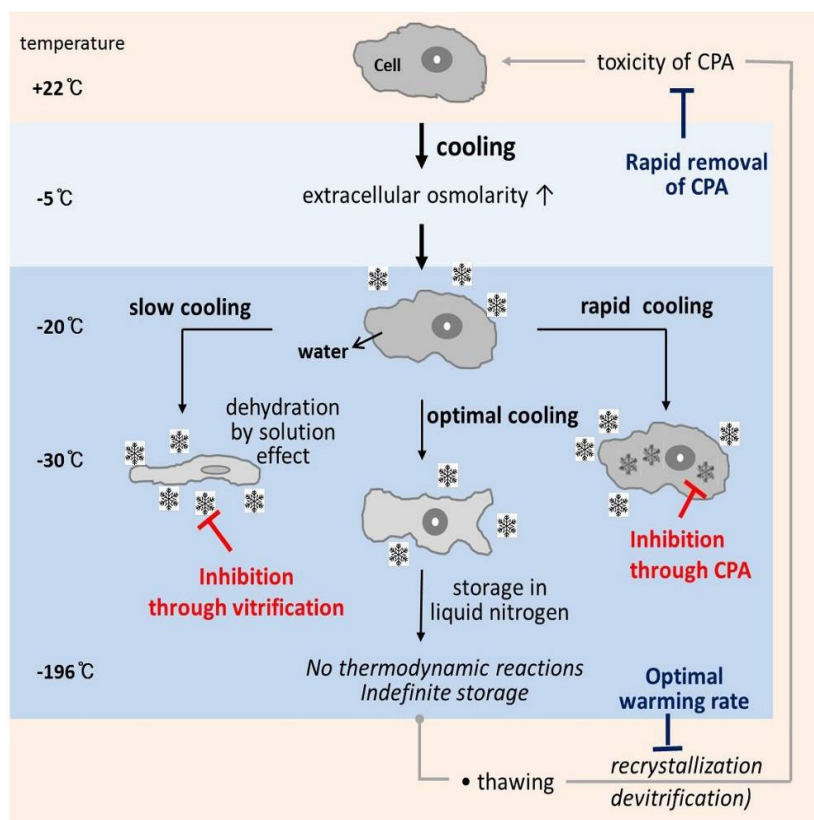
Μια πρόσφατη έρευνα εστίασε σε μία καινοτόμο μέθοδο [117] να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα του σακχάρου τρεχαλόζης ως CPA. Η τρεχαλόζη έχει αναφερθεί αρκετές φορές ως χρησιμοποιούμενο CPA για ανθρώπινα κύτταρα [118]. Το μοριακό βάρος της τρεχαλόζης είναι 343.3g/Mol, και δεν διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και έτσι χρειάζεται περισσότερο χρόνο επώασης για να διασφαλίσει ίδια επίπεδα ζωτικότητας των κυττάρων κατά την απόψυξη με αυτά των πρωτοκόλλων του DMSO [119]. Παρόλα αυτά, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η αργή ψύξη σε συνδυασμό με κρυοπροστατευτικό μέσον οπού περιέχει 10%wt DMSO είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για να επιτευχθεί υψηλή ζωτικότητα στα κύτταρα και ενώ υπάρχουν διάφορες ανησυχίες για την τρεχαλόζη κατά τη διάρκεια της απόψυξης, σε έρευνα των Benaroudj *et al* [120] φαίνεται ότι η τρεχαλόζη μπορεί να βοηθά στην απαλλαγή του κυτταρικού στρες.

11. Μειονεκτήματα της Κρυοσυντήρησης

11.1. Κρύο-τραυματισμός

Ο κρύο-τραυματισμός αποτελεί μεγάλο πρόβλημα στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Το κύτταρο μπορεί να υποστεί βλάβες, ακόμα και να οδηγηθεί στον θάνατο λόγω της ενδοκυττάριας δημιουργίας κρυστάλλων πάγου. Η δημιουργία κρυστάλλων πάγου είναι ο κύριος λόγος οπου χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικοί παράγοντες (CPAs), διότι ελέγχουν ή αποτρέπουν τη δημιουργία πάγου κατά τη διάρκεια της ψύξης των κυττάρων, αλλά όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, συχνά τα ίδια τα CPAs έχουν καταστροφική επίπτωση στα κύτταρα λόγω της τοξικότητάς τους. Έτσι, μια μεγάλη δοκιμασία των επιστημόνων οπου ασχολούνται με την κρυοβιολογία είναι να ελέγξουν την δημιουργία ενδοκυττάριας πάγου αλλά και την κυτταροτοξικότητα των CPAs [121].

Η δημιουργία ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας πάγου θέτει σε σοβαρό κίνδυνο τα κύτταρα. Η δημιουργία εξωκυττάριας πάγου προκαλεί αφυδάτωση στο κύτταρο στη προσπάθειά του να διατηρήσει οσμωτική ισορροπία με το περιβάλλον του. Η ενδοκυττάρια



δημιουργία πάγου μπορεί να βλάψει θανάσιμα το κύτταρο για δύο κύριους λόγους. Πρώτων, ο πάγος προκαλεί αφυδάτωση στο κύτταρο και δεύτερον, δομικά το κύτταρο υπόκειται βλάβες λόγω των κρυστάλλων πάγου[122,123]. Τα CPAs καταφέρνουν να περιορίσουν το πρόβλημα αυτό με αποτέλεσμα η επιβίωση των κυττάρων να αυξάνεται [121].

Εικόνα III-4: Τα φυσικά γεγονότα και ο κρυο-τραυματισμός που συμβαίνουν κατά τη ψύξη και την απόψυξη των κυττάρων. Ο κρυο-τραυματισμός προκαλείται, εν μέρει, από το κρυοπροστατευτικό διάλυμα (οδηγεί σε οσμωτικό σοκ) και από τον σχηματισμό ενδοκυττάριας πάγου (που οδηγεί σε διάσπαση των ενδοκυττάριας δομών). [135]

11.2. Τοξικότητα των Κρυοπροστατευτικών Παραγόντων

Το πρόβλημα όπου υπάρχει στο στάνταρτ κρυοπροστατευτικό μέσον (10% DMSO σε FBS), εστιάζεται αρχικά στην τοξικότητα του DMSO και τα προβλήματα που πιθανώς να προκαλεί το FBS.

Από την στιγμή όπου τα κύτταρα θα εκτεθούν στο DMSO οι φυσιολογικές θερμοκρασίες θα πρέπει να περιορίζονται διότι θεωρείται ότι είναι τοξικό σε θερμοκαρίες δωματίου [93]. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός με τον οποίο το DMSO δρα ως τοξικό είναι θεωρητικό. Το DMSO εκτός από κρυοπροστατευτικό μέσον χρησιμοποιείται επίσης και για την διανομή φαρμάκων στον οργανισμό λόγω της ιδιότητας του να διαπερνά τις μεμβράνες, αλλά και ως επαγωγέας διαφοροποίησης σε *in vitro* πειράματα [124]. Εκτιμάται ότι η θανατηφόρα συγκέντρωση του DMSO είναι 50%, ανά 2.5-8.9g/kg παρόμοια περίπου με εκείνη της αλκοόλης [124]. Οι ανησυχίες για το DMSO κινούνται γύρω από την ιδιότητά του να επάγει διαφοροποίηση [125] και στην πιθανότητα να είναι υπεύθυνο για ανεπιθύμητες αντιδράσεις όπως καρδιακή ανακοπή και εγκεφαλικά επεισόδια [126]. Λιγότερο σοβαρές αντιδράσεις όπου έχουν αναφερθεί είναι κοιλιακές κράμπες και ναυτία σε ασθενείς με λευχαιμία όπου τους χορηγήθηκαν «μη-πλυμένα» στελεχιαία βλαστικά κύτταρα [127].

Μια εργασία των Hunt *et al* το 2002, έδειξε την δράση του DMSO στα CD34+ κύτταρα προερχόμενα από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, ενώ δείχνει μόνο την επίδραση της έκθεσης στο DMSO χωρίς ψύξη, δεν εξέτασαν στην υπερ-έκθεση μετά την απόψυξη, και χρησιμοποίησαν χρονικά διαστήματα μόνο των 60 λεπτών. Έδειξαν ότι αυξάνοντας την συγκέντρωση του DMSO 2,5 φορές παραπάνω από τις στάνταρτ δοσολογίες (αύξηση στα 25%) με το πρωτόκολλο να ακολουθεί τους ίδιους χρόνους, δεν είχε σημαντική επίδραση στον δείκτη ανάκτησης. Επιπλέον ευρήματα αυτής της εργασίας ήταν ότι η έκθεση των CD34+ κυττάρων σε κρύο (θερμοκρασία 2°C) κρυοπροστατευτικό μέσο DMSO 25%, για 20, 40 και 60 λεπτά δεν είχε βλαβερή επίδραση στον δείκτη ανάκτησης των κυττάρων αλλά η έκθεσή σε κρυοπροστατευτικό μέσο DMSO θερμοκρασίας 20° C για 60 λεπτά είχε βλαβερή επίδραση για τα κύτταρα [128].

11.3. Απόψυξη

Η απόψυξη είναι σημαντικό βήμα στην κρυοσυντήρηση, όπου στοχεύει στη μετάβαση των κυττάρων από μια καταψυγμένη και υαλώδη φάση σε μια πιο βιώσιμη θερμοκρασία, καθιστώντας τα ικανά να διατηρήσουν τις πολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες. Για αυτό το σημαντικό βήμα, η βιβλιογραφία όσων αφορά την απόψυξη των κρυοσυντηρημένων ανθρώπινων κυττάρων είναι εντυπωσιακά περιορισμένη, και ως εκ τούτου υπάρχει μια έλλειψη κατανόησης πολλών μηχανισμών. Μέρος των πρωτοκόλλων απόψυξης από την ιστοσελίδα της Life Technologies [129] αναφέρει σχετικά:

1. Αφαιρέστε τα cryovial όπου περιέχουν τα κατεψυγμένα κύτταρα από το LN₂ και μεταφερτέ τα άμεσα σε υδατόλουτρο στους 37° C .
2. Αποψύξτε γρήγορα τα κύτταρα (<1 λεπτό) στριφογυρνώντας προσεχτικά τα cryovial στο υδατόλουτρο μέχρι ώσπου να παραμείνει μονάχα μια μικρή ποσότητα πάγου στο φιαλίδιο.
3. Μεταφέρετε το φιαλίδιο σε θάλαμο νηματικής ροής και πριν το ανοίξετε, περάστε την εξωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου με διάλυμα αιθανόλης 70%.
4. Μεταφέρετε την επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού μέσου σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέστε τα αποψυγμένα κύτταρα.
5. Φυγοκεντρήστε το εναιώρημα κυττάρων σε περίπου 200g για 5-10 λεπτά. Οι στροφές και οι διάρκειες της φυγοκέντρωσης ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων.
6. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παρατηρείστε την καθαρότητα του υπερκειμένου και την ορατότητα του σχηματισμένου σφαιριδίου. Σε άσηπτες συνθήκες, απορρίψτε το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το σχηματισμένο σφαιρίδιο κυττάρων.
7. Προσεχτικά επαναιωρήστε στα κύτταρα με νέο θρεπτικό μέσον, και μεταφέρετε τα στο κατάλληλο καλλιεργητικό δοχείο και στις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

Παρόλο που το πρωτόκολλο προτείνεται από σεβαστή εταιρεία, η ασάφεια κάποιων προτάσεων καθιστά τη διαδικασία της απόψυξης ελλιπή. Όπως προτείνεται και από την Life Technologies, η γενική αποδεχτή μέθοδος είναι η αφαίρεση των κυττάρων από τη κρυοσυντήρηση και η μεταφορά τους σε υδατόλουτρο των 37° C και η παραμονή τους

εκεί μέχρι ο πάγος να έχει σχεδόν λιώσει, παρόλα αυτά τα πρωτόκολλα όσον αφορά τους χρόνους αλλάζουν μέχρι αυτό το σημείο [87,130]

Σε μη δημοσιευμένα δεδομένα των Smith *et al.* [131] έδειξαν ότι τα φιαλίδια που τοποθετούνται στους 37°C χρειάζονται περίπου 140 δευτερόλεπτα να φτάσουν την θερμοκρασία των 0°C, και περίπου 10 δευτερόλεπτα επιπλέον, για κάθε 5° C αύξηση, και ακόμα 74 δευτερόλεπτα για να φτάσει τους 37°C, συνολικό περίπου χρόνο 3.5 λεπτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο κύριος σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της διαδικασίας κρυοσυντήρησης της βαρτονείου γέλης σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -100°C , για το χρονικό διάστημα ενός μήνα. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση βαρτονείου γέλης από ομφαλίους λώρους και έπειτα ακολούθησε κρυοσυντήρηση με τη χρήση κατάλληλων κρυοπροστατευτικών μέσων (Cryostor, VS55 και HMC) σε υγρό άζωτο. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η απόψυξη και καλλιέργεια του ιστού για τα χρονικά διαστήματα 7, 14 και 30 ημερών. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν στα MSCs προερχόμενα από όλες τις πειραματικές συνθήκες ήταν: ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, η βιωσιμότητα και η ανάλυση του ανοσοφαινότυπου των κυττάρων. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ανοσορρυθμιστικών ιδιοτήτων των MSCs, αξιολογώντας τη παραγωγή και την έκφραση του αντιγόνου HLA-G. Η ποιοτική εκτίμηση των MSCs έγινε μέσω της αξιολόγησης της έκφρασης των επιφανειακών δεικτών με την χρήση κυτταρομετρίας ροής. Παράλληλα, μελετήθηκε η έκφραση του αντιγόνου HLA-G, ως προς την διαλυτή και ως προς την μεμβρανική του μορφή. Για τον σκοπό αυτό, εκτελέστηκε γονιδιακός έλεγχος, έμμεσος ανοσοφθορισμός στα MSCs και ανοσοϊστοχημεία στο ιστό της βαρτονείου γέλης. Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε μη κρυοσυντηρημένος ιστός βαρτονείου γέλης – φρέσκος ιστός (native) ως αρνητικό δείγμα αναφοράς και ιστός ο οποίος αποθηκεύτηκε στους -196°C χωρίς την χρήση κρυοπροστατευτικών μέσων, (CPA-free) ως θετικό δείγμα αναφοράς.

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ «ΒΑΡΤΟΝΕΙΟΥ ΓΕΛΗΣ»

Απομόνωση τμημάτων (κατόπιν τεμαχισμού) από «Βαρτόναιο Γέλη» Ο.Λ.



2. ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ «ΒΑΡΤΟΝΕΙΟΥ ΓΕΛΗΣ»

Κρυοσυντήρηση ιστού «Βαρτονείου Γέλης» με:

4. VS55
5. Cryostor
6. Home made Cryostor

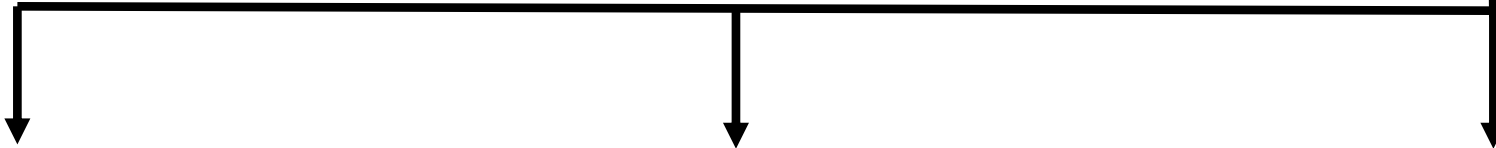


3. ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΩΝ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ

A) Απόψυξη κρυοσυντηρημένων τμημάτων και ιστού «Βαρτονείου Γέλης» με:

1. VS55
2. Cryostor
3. Home made Cryostor

B) Τοποθέτηση των δειγμάτων σε πλάκα των 6 πηγαδιών.



4 α. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ MSCs ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΑ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΑ

A) Έλεγχος κριτηρίων Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων σύμφωνα με την Διεθνή Εταιρεία Κυτταρικών Θεραπειών. (hMSCs-P2/P3)

- Μορφολογική μελέτη των κυττάρων.
- Διαφοροποίηση κυττάρων σε «οστεοκύτταρα», «χονδροκύτταρα» και «λιποκύτταρα».

4 β. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ MSCs ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΑ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΑ

Έλεγχος αντιγόνων HLA-G Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων προερχόμενα από κρυοσυντηρημένα ιστοτεμάχια. (hMSCs-P2/P3)

- Εξαγωγή mRNA
- RT-PCR/ PCR και έλεγχος γονιδίων
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v.
- Έμμεσος ανοσοφθορισμός έναντι HLA-G αντιγόνων

4 γ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ MSCs ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΑ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΑ

Λειτουργικός έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων προερχόμενα από κρυοσυντηρημένα ιστοτεμάχια.

- Αξιολόγηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού
- Έλεγχος βιωσιμότητας

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Εξοπλισμός

- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Leica- DMIL)
- Αντλία αναρρόφησης (Gilson Aspiration station)
- Αυτόματος μικροτόμος παραφίνης (Leica RM2255)
- Αυτόκαυστο (Tecno-Gaz)
- Δοχείο σταδιακής κατάψυξης, Mr. Frosty® (Nalgene)
- Επωαστικός κλίβανος αερίου CO₂ (Thermo Forma)
- Ζυγός (Mettler Toledo AE285)

- Ηλεκτρονικός ζυγός, ABJ 120-4NM (Kern)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Nuair)
- Θερμαινόμενη πλάκα (Bioline)
- Καταψύκτης -80°C (Kryotec)
- Κυτταρομετρητής ροής (Coulter Beckman EPICS XL-MCL)
- Μικροφυγόκεντρος (Eppendorf- Refrigerated Microcentrifuge 5417R)
- Σύστημα απεικόνισης πηκτωμάτων αγαρόζης (Uvitec Firereader - Gel documentation system)
- Ορθό μικροσκόπιο (Leica- DM L52)
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αγαρόζης (Olerup - Gel complete system)
- Υδατόλουτρο (Memmert)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf-Centrifuge 5804)
- Ψυγείο 4°C (Helmer)
- Vortex (VELP Scientifica)
- Συσκευή αυτοματοποιημένου μετρητή κυττάρων (Invitrogen)

2. Παρασκευή Γενικών Διαλυμάτων

2.1. Διάλυμα PBS 1x

2.1.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 ml (Vitlab)
- Φίλτρο διήθησης 0,22 μm (Corning)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- PBS 10x 500 ml (Gibco)
- Απεσταγμένο νερό στήλης B

Για την παρασκευή του διαλύματος PBS (1x), προστέθηκαν 100 ml PBS (10x) σε 900 ml απεσταγμένο νερό στήλης B. Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος σε φίλτρο διήθησεως 0,22 μm. Το διάλυμα PBS (1x) παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για μέγιστο χρονικό διάστημα από την παρασκευή του, τις 14 ημέρες.

2.2. Θρεπτικό Μέσο

2.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- α- MEM 500 ml (Gibco)
- Penicillin – Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
- L-glutamine 100x, 200 nM (Gibco)
- FBS 500 ml (Gibco)

Η παρασκευή του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιεργειών, έγινε εντός θαλάμου νηματικής ροής κλάσης II. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 115 ml FBS, 24 ml Penicillin- Streptomycin (1000 U/ml), 12 ml L-glutamine (200 nM) σε 500 ml α- MEM. Διατηρήθηκε στους 4ο C για μέγιστο χρονικό διάστημα από την παρασκευή του τις 14 ημέρες. Το διάλυμα που προκύπτει θα αναφέρεται ως θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο 20% FBS.

2.3. Alicots

2.3.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml (Greiner)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 15ml (Greiner)
- Penicillin – Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
- L-glutamine 100x, 200 nM (Gibco)
- FBS 500 ml (Gibco)

Το ισομοίρασμα πραγματοποιήθηκε σε εντός θαλάμου νηματικής ροής. Για τα Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml) και L-glutamine (200 nM) χρησιμοποιήθηκαν κωνικοί σωλήνες Falcon 15 ml και ισομοιράστικαν σε κάθε κωνικό σωλήνα από 12 ml. Για το FBS χρησιμοποιήθηκαν κωνικοί σωλήνες falcon των 50 ml οπού ισομοιράστικαν από 50 ml σε κάθε falcon. Οι σωλήνες μεταφέρθηκαν άμεσα στους -20° C.

3. Παρασκευή Διαλυμάτων Υαλοποίησης

3.1. HMC

3.1.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ζυγός(Metter Toledo AE285)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml (Greiner)
- Adenosine 10mM
- Glutathione 50mM
- Dextran 40 6%
- Sucrose 100mM
- Mannitol 100mM
- Lactobionate 1000mM
- Glucose 10 mM
- HEPES 250mM
- NaCl 100 mM
- KCl 100mM

- MgCl 50mM
- CaCl₂ 100mM
- KH₂PO₄ 100mM
- NaHCO₃ 50mM
- DMSO 5%
- Caspase II inhibitor 10 mM

Αρχικά δημιουργήθηκαν διαλύματα stock. Η παρασκευή του διαλύματος έγινε εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Σε κωνικό σωλήνα falcon των 50 ml προστέθηκαν 10 ml Adenosine, 2ml Glutathione, 3ml Dextra 40%, 5ml Sucrose, 10ml Mannitol, 0,5ml Lactobionate, 5ml Glucose, 5ml HEPES, 2,5ml NaCl, 1ml KCl, 0,5ml MgCl, 2ml CaCl₂, 2,5ml KH₂PO₄, 250 μl NaHCO₃, 5ml DMSO 5%, 138μl Caspase II inhibitor. Το κατόπιν διάλυμα συντηρήθηκε στους 4° C για το χρονικό διάστημα 14 ημερών.

3.2. Vitrification Solution 55 (VS55)

3.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ζυγός(Metter Toledo AE285)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml (Greiner)
- Δεξτρόζη 1000mM
- KH₂PO₄ 150mM
- K₂HPO₄ 420mM
- KCl 150mM
- NaHCO₃ 100mM
- 1,2 Propanediol 1300mM
- DMSO 1400Mm
- Formamide 2510mM
- Glutathione 50mM

Αρχικά δημιουργήθηκαν διαλύματα stock. Η παρασκευή του διαλύματος έγινε εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Αρχικά, σε κωνικό σωλήνα falcon των 50 ml προστέθηκαν 9,7 ml Δεξτρόζη, 5ml KH₂PO₄, 5ml K₂HPO₄, 5ml KCl, 5ml NaHCO₃, 5ml 1,2 Propanediol,

5ml DMSO, 620 µl Formamide, 2 ml Glutathione. Έπειτα το διάλυμα διατηρήθηκε στο ψυγείο των 4° C για χρονικό διάστημα 14 ημερών.

4. Ιστολογικός Έλεγχος Δειγμάτων

4.1. Μονιμοποίηση Δειγμάτων

4.1.1. Υλικά και Διαλύματα.

- Ποτήρι ζέσεως 50 ml (Duran)
- Μεταλλική λαβίδα (KLS Martin)
- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης (Βιοχ)
- Διάλυμα φορμόλης 10% v/v (Sigma)
- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- Διάλυμα PBS 1x

Τα ιστοτεμάχια Βαρτονείου Γέλης των Ο.Λ. τοποθετήθηκαν σε κασετίνες έγκλεισης και μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως οπού περιείχε διάλυμα φορμόλης 10% και παρέμειναν σε αυτό για ένα βράδυ. Έπειτα ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS 1x και μεταφέρθηκαν εντός διαλύματος αλκοόλης 70%.

4.2. Αυτοματοποιημένη Ιστολογική Τεχνική

4.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ιστοκινέτα (Leica TP 1020)

Η αυτοματοποιημένη ιστολογική τεχνική πραγματοποιήθηκε στην ιστοκινέτα του Παθολογανατομικού εργαστηρίου του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθήνας. Οι κασετίνες των δειγμάτων τοποθετήθηκαν εντός ιστοκινέτας και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα.

Στάδιο 1-Αφυδάτωση: Διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95% και 100% για 1 ώρα στο καθένα.

Στάδιο 2- Διαφανοποίηση: Δύο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης για 1 ώρα στο καθένα.

Στάδιο 3- Εμποτίση σε παραφίνη: Δύο διαδοχικά διαλύματα καθαρής παραφίνης για 1 ώρα στο καθένα.

Τελικό στάδιο της διαδικασίας αποτέλεσε η έγκλειση των δειγμάτων εντός παραφίνης και δημιουργίας των block μικροτόμισης.

4.3. Τομές Παραφίνης και Αποπαραφίνωση

4.3.1. Υλικά και Διαλύματα

- Μικροτόμος (Leica RM 2125)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (O.Kindler GMBH and CO)
- Υδατόλουτρο (Thermo Scientific)

Η μικροτόμιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Παθολογανατομικού εργαστηρίου του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθήνας. Οι τομές των δειγμάτων που λήφθηκαν είχαν πάχος 5 και 10 μm .

4.4. Προετοιμασία Τομών για Ιστολογική χρήση

4.4.1. Υλικά και Διαλύματα

- Διάλυμα ξυλόλης (Applichem)
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (Analar Normanpur)
- Διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95%
- Πλαστικά δοχεία (Bio Optica)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (O.Kindler GMBH and CO)

Προκειμένου να διεξαχθούν χρώσεις των ιστολογικών παρασκευασμάτων απαιτήθηκε το στάδιο της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης των τομών. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

Στάδιο 1- Αποπαραφίνωση: Δύο διαλύματα καθαρής ξυλόλης για 5 λεπτά.

Στάδιο 2- Ενυδάτωση: Διαλύματα αλκοολών 100% για 5 λεπτά, 95% για 2 λεπτά, 80% για 1 λεπτό, 50% για 1 λεπτό.

Στάδιο 3- Έκπλυση: Έκπλυση των δειγμάτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης.

Το επόμενο στάδιο ήταν η διεξαγωγή των εκάστοτε χρώσεων και αφυδάτωση των δειγμάτων. Η διαδικασία της αφυδάτωσης ποικίλει ανάλογα με τον τύπο της χρώσης που

χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Για τον λόγο αυτό το στάδιο της αφυδάτωσης περιγράφεται αναλυτικά σε κάθε χρώση.

5. Μικροσκόπηση, Επεξεργασία Εικόνων, Στατιστική Ανάλυση

5.1. Μικροσκόπηση Δειγμάτων

5.1.1. Υλικά -Διαλύματα.

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2).
- Ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP5).
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DMIRE2).
- Ορθό οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2).
- Ορθό συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP5 II).

Για την μικροσκόπηση των κυτταροκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IL. Η παρατήρηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε με το ορθό οπτικό μικροσκόπιο Leica DM LS2. Η μικροσκόπηση των δειγμάτων ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με το ορθό συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 II. Τέλος τα δείγματα στα οποία διεξήχθη αυτοφθορισμός, μικροσκοπήθηκαν με ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5.

5.2. Επεξεργασία εικόνων

5.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Πρόγραμμα λήψης και επεξεργασίας εικόνων LAS Suite v2. (Leica)
- Πρόγραμμα λήψης και επεξεργασίας εικόνων IC Capture 2.4
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων Image J 1.46 R (Wayne Rasband)

Η λήψη και επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με την χρήση των προγράμματος IC Capture 2.4. Η προσθήκη των scale bars έγινε με την χρήση του Image J.

5.3. Στατιστική Ανάλυση

5.3.1. Υλικά και Διαλύματα.

- Στατιστικό πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων Microsoft Excel 2015

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος Microsoft Excel 2015.

6. Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων από Ομφάλιο Λώρο

6.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM 1L)
- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml (Greiner)
- Τρυβλία Petri (Greiner, Hungary)
- Πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας 6 οπών, 6-well plates (Costar, Corning Life Sciences Inc., USA)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS Martin).
- Αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης των 5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο 20% FBS
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)

6.2. Διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

Για την απομόνωση MSCs από την βαρτόνιο γέλη ήταν αρχικά απαραίτητη η λήψη μικρότερων τμημάτων του ομφάλιου λώρου, κόβοντάς τον εγκάρσια, με τη βοήθεια μίας μεγάλης χειρουργικής λαβίδας και χειρουργικού ψαλιδιού. Για την περαιτέρω επεξεργασία, προτιμήθηκαν ιστοτεμάχια που υπήρχε απουσία πηγμάτων αίματος. Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια που επιλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε κλειστό κωνικό σωλήνα (falcon), ο οποίος περιείχε μικρή ποσότητα (περίπου 10ml) PBS 1X και ακολούθησε δυνατή ανακίνηση, για την απομάκρυνση του αίματος και τον καθαρισμό των ιστοτεμαχίων. Με τη βοήθεια της μεγάλης λαβίδας και μίας αιμοστατικής λαβίδας ακολούθησε η απομάκρυνση των αγγείων (η μια φλέβα και οι δύο αρτηρίες) του ομφάλιου λώρου, σε τρυβλίο Petri. Αρχικά, απομακρύνθηκε προσεκτικά η φλέβα, με τη τοποθέτηση της αιμοστατικής λαβίδας εσωτερικά της φλέβας και ασκώντας δύναμη αντίθετης κατεύθυνσης. Το εσωτερικό τμήμα πλέον είχε «ανοίξει» και ήταν εύκολος ο εντοπισμός και η απομάκρυνση των δύο αρτηριών. Αφού είχαν απομακρυνθεί όλα τα αγγεία, με αιμοστατική λαβίδα, επιλέχθηκαν τα τμήματα της βαρτονείου γέλης, τα οποία αφού συγκεντρώθηκαν τεμαχίστηκαν με το χειρουργικό ψαλίδι, έως ότου δημιουργηθεί μία άμορφη μάζα.

Με μία μικρή λαβίδα επιλέχθηκαν και λήφθηκαν ιστοτεμάχια, τα οποία ήταν μικρά και όσο το δυνατόν πιο σφαιρικά και τοποθετήθηκαν στις πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας, 6 οπών. Σε κάθε θέση (οπή) τοποθετήθηκαν από 8 έως 10 ιστοτεμάχια. Ακολούθησε προσθήκη 1ml θρεπτικού διαλύματος σε κάθε πηγάδι και η πλάκα μεταφέρθηκε σε επωαστικό κλίβανο αερίου CO₂, στους 37°C και με 5% CO₂.

Οι ιστοκαλλιέργειες ελέγχονταν στο ανάστροφο μικροσκόπιο ανά τακτά χρονικά διαστήματα και πραγματοποιούνταν αλλαγές θρεπτικού υλικού κάθε 5 ημέρες . Την 10 ημέρα μετά την έναρξη της ιστοκαλλιέργειας και εφόσον διαπιστωνόταν η εμφάνιση των πρώτων MSCs από τα ιστοτεμάχια στην πλαστική επιφάνεια της πλάκας, γινόταν πλύσιμο των πηγαδιών με 1-2 ml PBS 1X ώστε να απομακρυνθεί ο ιστός, απόρριψη του PBS 1x , και εκ νέου προσθήκη θρεπτικού μέσου. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού συνεχίστηκε κάθε 4 μέρες μέχρι να παρατηρηθεί κάλυψη ολόκληρης της πλαστικής επιφάνειας με MSCs.

7. Πλύσιμο Καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

7.1. Υλικά και Διαλύματα

- Πιπέτες 5 ml (Sarstedt)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS 1×
- Αποστειρωμένα Ρύγχοι tips
- Συσκευή Αναρρόφησης Aspirator
- Πλήρες Θρεπτικό Υλικό (20% FBS)

7.2. Διαδικασία Πλυσίματος Καλλιέργειας

Η διαδικασία του πλυσίματος MSC της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε την 10^η μέρα. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή αναρρόφησης με την οποία αφαιρέθηκε το πλήρες θρεπτικό υλικό που υπήρχε (15%FBS). Ακολούθησε προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1× και παραμονή του για 1 λεπτό. Η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος είχε ως σκοπό την επαναφορά του pH της καλλιέργειας στην αρχική του τιμή λόγω της αλλαγής που είχε υποστεί από τα παράγωγα του μεταβολισμού των κυττάρων. Στην φάση αυτή πραγματοποιήθηκε πλήρης απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος διότι διαφορετικά το εναπομείναν ρυθμιστικό διάλυμα προκαλεί αραίωση του θρεπτικού υλικού που προστέθηκε στην επόμενη φάση. Τέλος πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1 ml

πλήρες θρεπτικού μέσου (20% FBS) και μεταφορά της πλάκας των 6 πηγαδιών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

8. Ανακαλλιέργεια Μεσεγγυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

8.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM 1L)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 cm² (TNT)
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- Θρεπτικό μέσο 20%
- Θρυψίνη – EDTA (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)

8.2. Αποκόλληση Μεσεγγυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων και ανακαλλιέργεια

Οι πλάκες των 6 πηγαδιών (6-well plate) ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων την 18^η μέρα με την βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου. Στην περίπτωση όπου η επικάλυψη της πλαστικής επιφάνειας από κύτταρα άγγιζε το 70-80% σε τουλάχιστον 2-3 οπές από τις 6 συνολικά που διαθέτουν οι πλάκες, και ακολουθούσε ανακαλλιέργεια σε φλάσκα είτε των 25 cm² είτε των 75 cm². Συγκεκριμένα μεταφέρθηκαν οι πλάκες σε θάλαμο νηματικής ροής και απορρίφθηκε το θρεπτικό υλικό όπου υπήρχε και ακολούθησε προσθήκη 1 ml PBS 1x σε κάθε ένα από τα πηγάδια το οποίο παρέμεινε για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια απορρίφθηκε πλήρως όλη η ποσότητα του PBS 1x και προστέθηκαν 350 ml/πηγάδι διαλύματος θρυψίνης – EDTA με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την πλαστική επιφάνεια. Έπειτα μεταφέρθηκαν οι πλάκες στον κλίβανο στους 37^ο C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 10 λεπτά. Τέλος ακολούθησε αδρανοποίηση του διαλύματος θρυψίνης- EDTA με 1 ml θρεπτικού μέσου 20% και μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας είτε των 25 cm² είτε 75 cm² και προσθήκη επιπλέον θρεπτικού υλικού ώστε να γεμίσει η επιφάνεια της φλάσκας. Τέλος η φλάσκα τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 37^ο C με ατμόσφαιρα 5% CO₂

9. Κρυοσυντήρηση Βαρτονείου Γέλης Ομφαλίου Λώρου

9.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Καταψύκτης (-80) (όνομα)
- Δοχεία υγρού αζώτου (όνομα)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS Martin)
- Κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml (Greiner)
- Cryotubes (Greiner bio-one)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης των 5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Mr. Frosty containers (Thermo Fisher Scientific)
- Cryoboxes (Thermo Fisher Scientific)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- “Cryostor™” solution (BioLife Solutions, Monte Ville Parkway, USA)
- Vitrification Solution (VS55)
- Home Made Cryostor

9.2. Διαδικασία Κρυοσυντήρησης

Αρχικά απομονώθηκε ένα τμήμα από τον ομφάλιο λώρο (n=4) με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων και ακολούθησε πλύσιμο του τμήματος του ομφαλίου λώρου σε κωνικό σωληνάριο οπού περιείχε περίπου 10 ml PBS 1x ώστε να απομακρυνθούν κάθε στοιχεία αίματος και πηγμάτων. Έπειτα, απομακρύνθηκε η ομφαλική φλέβα και οι αρτηρίες και απομονώθηκε ο ιστός της βαρτονείου γέλης οπού κόπηκε σε λωρίδες (1=2 cm). Συγκεκριμένα, η βαρτόνιος γέλη, που απομονώθηκε από τον κάθε ομφάλιο, χωρίστηκε σε 12 τμήματα οπού ισομοιράστηκαν ως εξής: 4 cryotubes Cryostor Solution , 4 cryotubes VS55, 4 cryotubes HMC. Σε κάθε cryotube προστέθηκε περίπου 2 ml από κάθε κρυοπροστατευτικό διάλυμα, και όλα τα δείγματα καταψύχθηκαν ραγδαία (43°C/min) μέχρι να φτάσουν την θερμοκρασία των -100 °C, και ακολούθησε αργή ψύξη (3 °C/min) μέχρι την θερμοκρασία των -135 °C. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για ένα βράδυ σε δοχεία ισοπροπανόλης Mr. Frosty, στους -80 °C και τέλος τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο στους -196 °C.

Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε σε 4 διαφορετικά δείγματα ομφάλιων λώρων (σύνολο 48 cryotubes) και ο ρυθμός απόψυξης ήταν μετά από:

- 1^η εβδομάδα
- 2^η εβδομάδα
- 4^η εβδομάδα

Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control δείγματα από μη κατεψυγμένα ιστοτεμάχια βαρτονείου γέλης και ως θετικό control δείγματα οπού τοποθετήσαμε στο υγρό άζωτο χωρίς την χρήση κρύο-προστατευτικών μέσων.

10. Απόψυξη Βαρτονείου Γέλης και Καλλιέργεια Ιστοτεγείων

10.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Υδατόλουτρο (Memment)
- Φυγόκεντρος Centrifuge CellSep, 6/720R (Sanyo)
- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific)
- Κωνικοί σωλήνες προπυλενίου 50ml (Greiner)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Τρυβλία Petri (Greiner, Hungary)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης των 5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS Martin)
- Πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας 6 οπών, 6-well plates (COSTAR, Corning Life Sciences Inc., USA)
- Θρεπτικό μέσο 20%

10.2. Διαδικασία Απόψυξης και Καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκε απόψυξη του ιστού της Βαρτονείου γέλης της 1^{ης} και 2^{ης}, εβδομάδας. Αρχικά ετοιμάστηκαν στον θάλαμο νηματικής ροής, κωνικοί σωλήνες προπυλενίου με 40 ml PBS (1x). Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από το υγρό άζωτο τα cryotubes της 1^{ης} εβδομάδας (4 δείγματα βαρτονείου γέλης οπού είχαν κρυο-καταψυχθεί με το

Cryostor , 4 δείγματα με το VS55 και τέλος 4 δείγματα με το Home Made Cryostor, n=12) και τοποθετήθηκαν άμεσα σε υδατόλουτρο στους 37° C για λιγότερο από 1 λεπτό. Έπειτα μεταφέραμε τα δείγματα στον θάλαμο νηματικής ροής και το περιεχόμενο των cryotubes τοποθετήθηκε στα ήδη έτοιμα κωνικά σωληνάρια με το PBS 1X και μετέπειτα μεταφέρθηκαν στην φυγόκεντρο στο πρόγραμμα των 500 g για 6 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της απόψυξης ακολούθησε ο τεμαχισμός του ιστού με αποστειρωμένο ψαλίδι και στη συνέχεια με αποστειρωμένη μικρή λαβίδα τοποθετήθηκαν μικρά σφαιροειδή ιστοτεμάχια στις πλαστικές πλάκες 6 πηγαδιών. Ο ιστός που περιείχε το κάθε cryotube καλλιεργήθηκε σε 2 πλάκες 6 οπών. Συνολικά από την απόψυξη της κάθε εβδομάδας είχαμε 24 πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας. Αφού τοποθετήθηκαν οι τεμαχισμένοι ιστοί της βαρτονειού γέλης στις οπές των καλλιεργητικών οπών ακολούθησε η προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου. Οι πλάκες με τις ιστοκαλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστικό κλίβανο αερίου CO₂, στους 37°C και με 5% CO₂. Η ίδια διαδικασία ακολούθησε σε όλες τις εβδομάδες των αποψύξεων.

11. Λειτουργικός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

11.1. Υλικά και Διαλύματα

- Συσκευή αυτοματοποιημένου μετρητή κυττάρων (Invitrogen)
- 5 mL φιαλίδια (Greiner)
- Αυτόματη πιπέτα 10 μL (Gilson)
- Αποστειρωμένοι ρύγχι αυτόματων πιπετών (AHN Biotechnologie GmbH, Germany)
- Διάλυμα χρωστικής Trypan blue 0,4% (Invitrogen, USA)
- Πλάκες αυτόματης μέτρησης (Invitrogen, Korea)

11.2. Μέτρηση Αριθμού κυττάρων

Η χρωστική Trypan blue χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ζωτικότητας των κυττάρων και χρωμάτισε νεκρά ή αποπτωτικά κύτταρα. Τα ζωντανά κύτταρα, των οποίων οι κυτταρικές μεμβράνες δεν παρουσίαζαν αλλοιώσεις, δεν απορρόφησαν την χρωστική και άρα δεν ήταν χρωματισμένα. Για τη μέτρηση των κυττάρων κάθε δείγματος έγινε αραιώση 1:1 σε διάλυμα χρωστικής Trypan blue. Συγκεκριμένα με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας μεταφέρθηκαν 10 μl από το αντιπροσωπευτικό δείγμα των κυττάρων σε φιαλίδιο, το οποίο

περιείχε 10 μl διαλύματος χρωστικής και το μίγμα αναδεύτηκε με επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις. Στη συνέχεια, πάρθηκε δείγμα 10 μl από το παραπάνω μίγμα και μεταφέρθηκε στην πλάκα αυτόματης μέτρησης, η οποία τοποθετήθηκε στην συσκευή. Ο αριθμός των κυττάρων και το ποσοστό της βιωσιμότητας τους υπολογίστηκαν αυτόματα από την συσκευή.

12. Ρυθμός Πολλαπλασιασμού Κυττάρων

Κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων από φλάσκες καλλιέργειας, συλλεγόταν αντιπροσωπευτικό δείγμα 20μl, με ώστε να μετρηθεί ο αριθμός κυττάρων της καλλιέργειας και να υπολογιστεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Cell Doubling Time). Με το CDT, υπολογίζεται ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για το διπλασιασμό των κυττάρων στην καλλιέργεια. Για το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$CDT = \frac{t}{\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) \times 3,32}, [132]$$

Όπου:

t = χρόνος σε ώρες

N = τελικός αριθμός κυττάρων

N₀ = αρχικός αριθμός κυττάρων

3,32 = σταθερά

13. Ανοσοφαινοτυπικός Χαρτηρισμός Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

13.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κυτταρομετρο (Beckman Coulter)
- Αυτόματες πιπέτες 10-200 μl (Gilson)
- Θρυψίνη – EDTA (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα: CD90- FITC, ABC-FITC, CD29-

FITC, CD19-FITC, CD31-FITC, CD45-FITC, CD105-PE, CD73-PE, CD44-PE, CD3-PE, CD45-PC5, CD14-PC5, HLA-DR-PC5 (Beckman Coulter, France)

13.2. Προσδιορισμός Επιφανειακών Δεικτών - Κυτταρομετρία Ροής

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας με Trypsin-EDTA 0,05% και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων με PBS 1x στα 500g για 6 λεπτά. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και έγινε ανασύσταση των κυττάρων με 1 ml PBS 1x και λήφθηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα των 20 μl για τη καταμέτρηση των κυττάρων με την χρωστική Trypan Blue. Για κάθε δείγμα χρειάστηκε περίπου 1×10^5 κύτταρα όπου ισομοιράστηκαν σε 7 σωληνάρια και ακολούθησε η προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

- 1° σωληνάριο: μόνο κύτταρα (χωρίς αντισώματα)
- 2° σωληνάριο: CD90- FITC, CD105-PE, CD45-PC5
- 3° σωληνάριο: ABC-FITC, CD73-PE, CD45-PC5
- 4° σωληνάριο: CD29-FITC, CD44-PE, CD45-PC5
- 5° σωληνάριο: CD19-FITC, CD3-PE, CD45-PC5
- 6° σωληνάριο: CD31-FITC, CD14-PC5
- 7° σωληνάριο: CD45-FITC, HLA-DR-PC5
 - ❖ Για όσα μονοκλωνικά είναι συζευγμένα με PE και FITC: 20 μl / δείγμα
 - ❖ Για όσα μονοκλωνικά είναι συζευγμένα με PC5: 10 μl / δείγμα

Μετά την προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση για 20 λεπτά, σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου Στο τέλος της επώασης προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X και όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 6 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml PBS 1X σε όλα τα σωληνάρια και vortex. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο κυτταρόμετρο.

14. Διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

14.1. Οστεογενής Διαφοροποίηση

14.1.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific).
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM 1L).
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair).
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 cm² (TNT).
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt).
- Θρεπτικό μέσο 15%
- Θρυψίνη – EDTA (Chembiotin)
- Διάλυμα PBS 1x
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- α- MEM 500 ml (Gibco)
- Penicillin – Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
- Osteogenic supplements (Gibco)
- Δεξαμεθαζόνη (STem Cell Technologies)
- Ασκορβικό οξύ (STem Cell Technologies)

14.1.2. Τεχνική

Για την παρασκευή του διαφοροποιητικού μέσου των «οστεοκυττάρων», απαιτήθηκαν 7,5 ml Osteogenic supplements, 5 μl δεξαμεθαζόνης 0,1 μM, 250 μl ασκορβικού οξέος 20 ng/ml, 100 μl Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml) σε 42,5 ml α-MEM. Το παρόν διάλυμα διατηρήθηκε στους 4ο C για μέγιστο χρονικό διάστημα από την παρασκευή του τις 14 ημέρες.

Για την διαφοροποίηση των MSCs σε «οστεοκύτταρα», χρησιμοποιήθηκαν 100.000 κύτταρα 3^{ης} ανακαλλιέργειας (passage 3-P3), τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλάκα των 6 πηγαδιών με 1ml θρεπτικού μέσου 15% ανά πηγάδι. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και έκπλυση αυτών με διάλυμα PBS 1x. Απόρριψη του διαλύματος PBS 1x και προσθήκη 1 ml διαφοροποιητικού μέσου οστεοκυττάρων. Ακολούθησε μεταφορά της πλάκας στον κλίβανο στους 37^ο C με 5% CO₂. Το

διαφοροποιητικό μέσο αλλάζοταν 3 φορές την εβδομάδα για συνολικό χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων.

14.2. Λιπογενής Διαφοροποίηση

14.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM 1L)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 cm² (TNT)
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- Θρεπτικό μέσο α- MEM 15% (Gibco)
- Adipogenic supplements (Gibco)
- Θρυψίνη – EDTA (Chembiotin)
- Διάλυμα PBS 1x
- Penicillin – Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)

14.2.2. Τεχνική

Για την παρασκευή του διαφοροποιητικού μέσου των «λιποκυττάρων», απαιτήθηκαν 5 ml Adipogenic supplements 100 μl Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml) σε 45 ml α-MEM. Το παρών διάλυμα διατηρήθηκε στους 4° C με μέγιστο χρονικό διάστημα από την παρασκευή του τις 14 ημέρες. Για την διαφοροποίηση των MSCs σε «λιποκύτταρα», χρησιμοποιήθηκαν 100.000 κύτταρα P3, τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλάκα των 6 πηγαδιών με 1ml θρεπτικού μέσου 15% ανά πηγάδι. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και έκπλυση αυτών με διάλυμα PBS 1x. Απόρριψη του διαλύματος PBS 1x και προσθήκη 1 ml διαφοροποιητικού μέσου «λιποκυττάρων». Ακολούθησε μεταφορά της πλάκας στον κλίβανο στους 37° C με 5% CO₂. Το διαφοροποιητικό μέσο αλλάζοταν 3 φορές την εβδομάδα για συνολικό χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων.

14.3. Χονδρογενής Διαφοροποίηση

14.3.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (Thermo Scientific)
- Φυγόκεντρος (Hermle)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM 1L)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 cm² (TNT)
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- Σωλήνας προπυλενίου 15 ml (Greiner)
- Θρεπτικό μέσο 15%
- Θρυψίνη – EDTA (CHEMBIOTIN)
- Διάλυμα PBS 1x
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml (Sarstedt)
- A- MEM 500 ml (Gibco)
- Penicillin – Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
- TGF-β1 (Invitrogen)
- Insulin –Transferin Selenium, ITS (Biomedical AB)
- Δεξαμεθαζόνη (Stem Cell Technologies)
- Ασκορβικό οξύ (Stem Cell Technologies)

14.3.2. Τεχνική

Για την παρασκευή του διαφοροποιητικού μέσου των «*χονδροκυττάρων*», απαιτήθηκαν 10 μl δεξαμεθαζόνης 0,1 μM, 35 μl ασκορβικού οξέος 10 ng/ml, 100 μl ITS, 20 μl TGF-β1 5μg/ml, 100 μl Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml) σε 9,835 ml D-MEM. Το παρών διάλυμα διατηρήθηκε στους 4^ο C με μέγιστο χρονικό διάστημα από την παρασκευή του τις 14 ημέρες.

Για την διαφοροποίηση των MSCs σε «*χονδροκύτταρα*», χρησιμοποιήθηκαν 750.000 κύτταρα (P3), τα οποία τοποθετήθηκαν σε σωλήνα προπυλενίου 15 ml με 1ml θρεπτικού μέσου 20%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση αυτών στα 500g για 6 λεπτά. Απόρριψη του θρεπτικού μέσου 15% και προσθήκη 2 ml διαφοροποιητικού μέσου «*χονδροκυττάρων*»

Ακολούθησε μεταφορά αυτών στον κλίβανο στους 37° C με 5% CO₂. Το διαφοροποιητικό μέσο αλλαζόταν 3 φορές την εβδομάδα για συνολικό χρονικό διάστημα τεσσάρων εβδομάδων.

15. Ιστολογικές Χρώσεις

Λίστα Ιστολογικών Χρώσεων

No	Χρώση	Στόχος
1.	Αιματοξυλίνη- Εοσίνη	Πυρήνες-εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
2.	Sirius Red	Κολλαγόνο εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
3.	Toluidine Blue.	Γλυκοζαμινογλυκάνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
4.	Alcian Blue	Γλυκοζαμινογλυκάνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

15.1. Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη

15.1.1. Υλικά και Διαλύματα

- Απαγωγός (Pharmaceutical Lab Furniture)
- Πλαστικά δοχεία (Bio Optica)
- Μεταλική λαβίδα (KLS Martin)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (O.Kindler GMBH and CO)
- Καλυπτρίδες (VWR International)
- Διάλυμα ξυλόλης (Applichem)
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (Analar Normanpur)
- Διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95%
- Ισοπροπανόλη (Scharleu)
- Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer (Sigma)
- Διάλυμα Εωσίνης (Sigma)
- Νερό βρύσης
- Διάλυμα κάλυψης DPX

15.1.2. Διαδικασία Χρώσης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αποπαραφίνωση των τομών που λήφθηκαν ούτως ώστε να μπορέσει να δράσει η χρώση. Η αποπαραφίνωση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα 60°C για 15 λεπτά και η παραφίνη σταδιακά άρχισε να λιώνει. Ακολούθησε η τοποθέτηση τους σε ξυλόλη για 20 λεπτά και ενυδάτωση των τομών. Ειδικότερα οι τομές τοποθετήθηκαν σε απόλυτη αλκοόλη για 5 λεπτά, κατόπιν σε 96° για 2 λεπτά, 80° για 2 λεπτά και τέλος σε 50° για 2 λεπτά και τέλος ξέπλυμα των τομών σε νερό. Το επόμενο στάδιο που ακολούθησε είναι η χρώση των τομών με Αιματοξυλίνη/ Ηωσίνη. Οι τομές τοποθετήθηκαν στο διάλυμα της Αιματοξυλίνης για 30 δευτερόλεπτα και εν συνεχεία ακολούθησε πλύση αυτών (τρεις φορές). Εν συνεχεία οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν στην Ηωσίνη για 30 δευτερόλεπτα και ακολούθησε πλύση αυτών τρεις διαδοχικές φορές. Τελευταίο στάδιο της τεχνικής αυτής αποτέλεσε η αφυδάτωση των τομών σε διαλύματα αυξανόμενου βαθμού αλκοόλης. Πιο συγκεκριμένα οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης 80% για 30 δευτερόλεπτα, διάλυμα αλκοόλης 95% για 30 δευτερόλεπτα, σε δύο διαλύματα απόλυτης αλκοόλης 100% για 1 λεπτό στην καθεμία και τέλος σε δυο διαλύματα ξυλόλης

για 3 λεπτά. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκε το DPX για βελτίωση του δείκτη διάθλασης και ακολούθησε η μικροσκόπηση αυτών.

15.2. Sirius Red

15.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Απαγωγός (Pharmaceutical Lab Furniture)
- Πλαστικά δοχεία (Bio Optica)
- Μεταλική λαβίδα (KLS Martin)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (O.Kindler GMBH and CO)
- Καλυπτρίδες (VWR International)
- Διάλυμα ξυλόλης (Applichem)
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (Analar Normanpur)
- Διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95%
- Solution A - Sirius red (Direct Red 80 Sigma-Aldrich)
- Solution B - Sirius red
- Νερό βρύσης
- Διάλυμα κάλυψης DPX

15.2.2. Διαδικασία Χρώσης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αποπαραφίνωση των τομών. Ακολούθησε η τοποθέτηση τους σε ξυλόλη για 20 λεπτά και ενυδάτωση των τομών. Συγκεκριμένα οι τομές τοποθετήθηκαν σε 100° αλκοόλη για 5 λεπτά, έπειτα σε 96° για 2 λεπτά, 80° για 2 λεπτά και τέλος σε 50° για 2 λεπτά και τέλος ξέπλυμα των τομών σε νερό. Το επόμενο στάδιο που ακολούθησε είναι η χρώση των τομών με τη χρώση Sirius Red. Οι τομές τοποθετήθηκαν στο διάλυμα A (Solution A) για 30 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο διάλυμα B (Solution B) για ακόμα 30 λεπτά και ακολούθησε πλύση αυτών (τρεις φορές). Τελευταίο στάδιο της τεχνικής αυτής αποτέλεσε η αφυδάτωση των τομών σε διαλύματα αυξανόμενου βαθμού αλκοόλης. Πιο συγκεκριμένα οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης 80% για 30 δευτερόλεπτα, διάλυμα αλκοόλης 95% για 30 δευτερόλεπτα, σε δύο διαλύματα απόλυτης αλκοόλης 100% για 1 λεπτό στην καθεμία και

τέλος σε δυο διαλύματα ξυλόλης για 3 λεπτά. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκε το DPX για βελτίωση του δείκτη διάθλασης και ακολούθησε η μικροσκοπηση αυτών.

Χαρακτηριστικά χρώσης:

Κολλαγόνο έντονο κόκκινο σε κίτρινο φόντο.

Πυρήνες: αν έχουν βαφτεί οι πυρήνες ιδανικό χρώμα για αυτούς είναι το μαύρο αλλά μπορούν να εμφανιστούν και σε γκρι ή ελαφρώς καφέ χρώμα.

15.3. Χρώση Διαφοροποίησης Οστεοκυττάρων

15.3.1. Υλικά και Διαλύματα

- Αιθανόλη 70°
- Απεσταγμένο νερό στήλης B
- Alizarin Red S (Sigma-Aldrich)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης των 5, 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας, 0,45 μm (Corning Life Sciences Inc., Germany)
- Ζυγός (Mettler Toledo AG285)
- Συσκευή μέτρησης του pH (Hanna)

15.3.2. Παρασκευή Χρώσης Alizarin Red-S

Σε ηλεκτρονικό ζυγό, ζυγίστηκε 1 gr Alizarin Red S και διαλύθηκε σε 85 ml απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μεταξύ 4,1- 4,3 με υδροξείδιο του αμμωνίου και στη συνέχεια προστέθηκε απεσταγμένο νερό έως τα 100 ml. Πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα της χρώσης. Η χρώση αυτή είναι ειδική για εναποθέσεις ασβεστίου οπού φαίνονται στο μικροσκόπιο με ένα πορτοκαλί κόκκινο χρώμα.

Για την μονιμοποίηση των κυττάρων προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι 3 ml αιθανόλης 70%, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια η αιθανόλη απορρίφθηκε και ακολούθησε η προσθήκη 5 ml διαλύματος Alizarin Red S για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, η χρωστική απορρίφθηκε και ακολούθησε πλύση με αιθανόλης 70% .

15.4. Χρώση Διαφοροποίησης Λιποκυττάρων

15.4.1. Υλικά και Διαλύματα

- Αιθανόλη (VWR International, EC)
- Ισοπροπανόλη (Fluka)
- Φορμόλη (Fluka)
- Απεσταγμένο νερό στήλης B
- Oil Red O (Sigma-Aldrich)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης των 5, 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας, 0,45 μm (Corning Life Sciences Inc., Germany)
- Ζυγός (Mettler Toledo AG285)

15.4.2. Παρασκευή Χρώσης Oil Red-O

Σε ηλεκτρονικό ζυγό, ζυγίστηκαν 100 mg Oil Red O, τα οποία διαλύθηκαν σε 100 ml ισοπροπανόλης, για την παρασκευή 100 ml stock διαλύματος. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος 56°C για 60 λεπτά. Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος χρώσης χρησιμοποιήθηκαν 30 ml του stock διαλύματος και 20 ml απεσταγμένου νερού, στο οποίο ακολούθησε φιλτράρισμα. Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδικών εγκλείστων στα κύτταρα, τα οποία και βάφονται κόκκινα.

Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων αρχικά προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι 3 ml διαλύματος φορμόλης για 30 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του διαλύματος και έκπλυση με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι 3 ml ισοπροπανόλης για 3 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 5 ml διαλύματος Oil Red O για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έκπλυση ισοπροπανόλη και προστέθηκε 1 ml διαλύματος αιματοξυλίνης για 1 λεπτό. Τέλος, τα πηγάδια πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης και συνεχίστηκε μικροσκόπηση αυτών.

15.5. Χρώση Διαφοροποίησης Χονδροκυττάρων

15.5.1. Υλικά και Διαλύματα

- Διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% (SIGMA-ALDRICH)
- Απόλυτη αλκοόλη
- Ξυλόλη
- Παραφίνη
- Θήκες βιοψίας
- Μικροτόμος παραφίνης (Leiga)
- Υδατόλουτρο (Memment)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- DPX mountant for microscopy
- Επωαστικός κλίβανος (HEPAFILTEX)
- Block

15.5.2. Μονιμοποίηση Ιζήματος Χονδροκυττάρων

Προκειμένου η χρώση να βάλει επιτυχώς τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα θα πρέπει να γίνει μονιμοποίηση του ιζήματος και στη συνέχεια μικροτόμηση. Η μονιμοποίηση του ιζήματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις καθιερωμένες μεθόδους της ιστολογικής τεχνικής, ειδικότερα με την προσθήκη απόλυτης φορμαλδεΐδης η οποία θα παραμείνει για 24 ώρες και ακολούθησε η εμπότιση του ιζήματος σε παραφίνη. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλύσιμο του ιζήματος κάτω από τρεχούμενο νερό με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας της φορμαλδεΐδης. Ακολούθησε αφυδάτωση του ιζήματος για την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού η οποία πραγματοποιήθηκε με αυξανόμενο βαθμό αλκοολών. Αρχικά το ιζήμα προστέθηκε σε διάλυμα αλκοόλης 30° και κατόπιν 50°, 70°, 80°, 90°, 95° και τέλος σε απόλυτη αλκοόλη. Ο χρόνος παραμονής του ιζήματος σε κάθε διάλυμα αλκοόλης ήταν από 30 λεπτά. Το επόμενο στάδιο της ιστολογικής τεχνικής αποτελεί η διαφανοποίηση των ιζημάτων που έχει ως σκοπό την απομάκρυνση της αλκοόλης. Η διαφανοποίηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη ξυλόλης στο ιζήμα. Ακολουθεί η εμπότιση των ιζημάτων σε παραφίνη και βαθμιαία αντικατάσταση της ξυλόλης από την παραφίνη σε επωαστικό κλίβανο στους 58°C. Τα ιζήματα τοποθετήθηκαν μέσα σε μίγμα το οποίο αποτελείται από 1 μέρος παραφίνης και 3 μέρη ξυλόλης, στην συνέχεια σε

μίγμα ίσων μερών και τελικά σε μίγμα με 3 μέρη παραφίνης και 1 μέρος ξυλόλης μέχρι να ακολουθήσει η μεταφορά τους σε καθαρή παραφίνη. Η διάρκεια της διαδικασίας αυτής εξαρτάται από το μέγεθος του ιστού που πρόκειται να εμποτιστεί με παραφίνη. Τέλος το ίζημα τοποθετείτε σε ειδικά καλούπια blocks στα οποία προστίθεται ποσότητα παραφίνης με σκοπό της έγκλειση αυτού. Η δημιουργία του block αποτελεί το τελικό στάδιο της ιστολογικής τεχνικής η οποία ολοκληρώνεται με την μικροτόμηση του ιστού.

15.5.3. Υλικά και Διαλύματα

- Απόλυτη Αιθανόλη (VWR International, EC)
- Ξυλόλη (Sigma-Aldrich)
- Απεσταγμένο νερό στήλης B
- Ισοπροπανόλη (Fluka)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Toluidine blue (Sigma-Aldrich)
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας, 0,45 μm (Corning Life Sciences Inc., Germany)
- DPX mountant for microscopy, (Sigma-Aldrich)
- Καλυπτρίδες πλάκες (Becton Dickinson)

15.5.4. Παρασκευή Toluidine Blue

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση των τομών, με με θερμομανση των αντικειμενοφόρων πλάκων στους 60°C για 20 λεπτά, στη θερμομαντική πλάκα. Στη συνέχεια, οι τομές εμποτίστικαν 2 φορές στην ξυλόλη για 10-15 λεπτά και ακολούθησε ενυδάτωσή τους με βαθμιαία σειρά αλκοολικών διαλυμάτων. Για την ενυδάτωση, οι τομές τοποθετήθηκαν σε απόλυτη αλκοόλη για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε αιθανόλη 95% για 2 λεπτά, 80% για 2 λεπτά, 50% για 2 λεπτά και τέλος τρεις φορές σε απεσταγμένο νερό.

Για τη παρασκευή της χρώσης Toluidine blue 1% w/v, ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 50 mg Toluidine blue σε 50ml διαλύματος ισοπροπανόλης / PBS 1:1 (v/v). Το διάλυμα αναδεύτηκε καλά, ώστε να διαλυθεί πλήρως η χρωστική και χρησιμοποιήθηκε φίλτρο πριν την χρήση του. Η χρώση αυτή έχει υψηλή συγγένεια με τα όξινα συστατικά του ιστού,

όπως οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοζαμινογλυκάνες στους χόνδρους, οι οποίοι βάφονται μωβ. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μεταχρωματικό.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις αποπαραφινωμένες και ενυδατωμένες τομές τοποθετήθηκαν στο διάλυμα της χρώσης για 15 λεπτά. Ακολούθησε πλύση των αντικειμενοφόρων πλακών σε τρεχούμενο νερό και αφυδάτωσή τους με βαθμιαία σειρά αλκοολικών διαλυμάτων. Τελικά, οι τομές εμποτίστηκαν σε ξυλόλη 2 φορές για 10 λεπτά και έγινε προσθήκη DPX και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

16. Ανοσοϊστοχημεία

16.1. Υλικά και Διαλύματα

- EnVision FLEX Target Retrieval Solution High αραιώση 1:50
- Wash Buffer Solution 1:20
- Tris HCl
- DAB solution
- Απεσταγμένο νερό
- 1st Ab HLA-G (1:1000, Catalog MA1-10359, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- 2nd Ab FITC-conjugated mouse IgG antibody (1:100, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)

16.2. Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση των τομών στους 65° για 1 ώρα στη θερμαινόμενη πλάκα στο εργαστήριο της ιστοπαθολογίας και τοποθέτηση των τομών στη ξυλόλη για 20 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε ενυδάτωση των τομών όπου τοποθετήθηκαν σε βαθμιαία σειρά αλκοολικών διαλυμάτων, συγκεκριμένα σε 100° αλκοόλη για 5 λεπτά, 96° για 2 λεπτά, 80° για 2 λεπτά και τέλος σε 50° για 2 λεπτά και τέλος ξέπλυμα των τομών σε νερό. Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση των τομών σε προ θερμασμένο διάλυμα EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH στο υδατόλουτρο στους 95° C για 15 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε δύο φορές ξέπλυμα των τομών με wash buffer για 5 λεπτά και προσθήκη Peroxidase Blocking Reagen για 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί αποκλεισμός της

δραστικότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη του πρώτου αντισώματος και ακολούθησε επώαση με αυτό για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολούθησε πλύσιμο με washing buffer 2 φορές για 5 λεπτά και στη συνέχεια έγινε η προσθήκη του δευτερεύον αντισώματος όπου επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύσιμο των αντικειμενοφόρων πλακών με washing buffer 2 φορές για 5 λεπτά, και κάλυψη των κυττάρων με διάλυμα DAB και επώαση με αυτό για 10 λεπτά σε σκοτεινό σημείο. Επόμενο βήμα ήταν ξανά το πλύσιμο των ιστών με washing buffer 2 φορές για 5 λεπτά και η τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε αιματοξυλίνη για 2 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακών σε απεσταγμένο νερό και ακολουθήθηκε η διαδικασία της αφυδάτωσης με εμπότιση των πλακών σε βαθμιαία αυξανόμενο διάλυμα αλκοόλης. Τέλος στις πλάκες τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες με την προσθήκη DPX.

17. Μοριακός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

17.1. Εξαγωγή m-RNA

17.1.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος. (Eppendorf Centrifuge 5417R)
- Καταψύκτης -80° C (Thermo Scientific)
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μl (Gielson)
- Eppendorf 1,5 ml (Kisker Biotech)
- Πλάκα 96 πηγαδιών (Costar)
- Διάλυμα TRI (Sigma)
- Θρυψίνη 0,5% – EDTA (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- Χλωροφόρμιο 1L (Applichem)
- Ισοπροπανόλη (Scharleu)
- Αιθανόλη 75 %
- Ύδωρ δίχως RNase (Qiagen Kit)

17.1.2. Πρωτόκολλο

Η απομόνωση του RNA από τα MSCs πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του Passage 3. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων με την προσθήκη θρυψίνης 0,5% και φυγοκέντρωση τους στα 500 g για 6 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε

μέτρηση των κυττάρων και προσθήκη 1 ml διαλύματος TRI ανά 250 μ L δείγματος και ανάδευση κυττάρων με το αντιδραστήριο μέχρι πλήρη λύση των κυττάρων. Ακολούθησε προσθήκη 200 μ l χλωροφορμίου, ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα , επώαση 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4° C. Με πολύ μεγάλη προσοχή απομόνωση της υδατικής φάσης, μεταφορά της σε καθαρό eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 500 μ l ισοπροπανόλης. Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4o C. Απόρριψη του υπερκειμένου με πολύ μεγάλη προσοχή ώστε να μην απομακρυνθεί το ίζημα RNA , και κατόπιν προσθήκη 1 ml αιθανόλης 75%. Ήπια ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4o C. Αναρρόφηση όλης της ποσότητας του υπερκειμένου με αυτόματη πιπέττα και παραμονή του δείγματος RNA για 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 30 μ l ύδατος χωρίς RNase. Τα δείγματα RNA φυλάχτηκαν σε καταψύκτη στους -80° C.

17.2. Σύνθεση cDNA – RT-PCR

17.2.1. Υλικά και Διαλύματα

- Μηχάνημα PCR (Eppendorf)
- Omniscript RT kit (Qiagen)
- Αυτόματη πιπέττα 0,1-2 μ l (Gielson)
- Αυτόματη πιπέττα 2-20 μ l (Gielson)
- Πλάκα 96 πηγαδιών (Qiagen)
- Ύδωρ δίχως RNase (Qiagen Kit)

17.2.2. Πρωτόκολλο RT-PCR

Μετά την απομόνωση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA των δειγμάτων ακολούθησε RT-PCR. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με μόνη τροποποίηση την αύξηση του τελικού όγκου της αντίδρασης από τα 20 στα 25 μ l (Πίνακας).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ RT-PCR	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
10x Buffer RT	2,5 μ l
dNTPs	2,5 μ l
Taq DNA Polymerase	0,125 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l
Δείγμα	1 μ l
RNAse free water	16,8 μ l
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	25 μl

17.3. PCR

17.3.1. Υλικά και Διαλύματα

- Taq DNA Polymerase and Taq PCR Core kit (Qiagen)
- Μηχάνημα PCR (Eppendorf)
- Αυτόματη πιπέττα 0,1-2 μ l (Gielson)
- Αυτόματη πιπέττα 2-20 μ l (Gielson)
- Πλάκα 96 πηγαδιών (Qiagen)
- Ύδωρ δίχως RNAse

17.3.2. Πρωτόκολλο PCR

Η PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με μόνη τροποποίηση την μείωση του τελικού όγκου της αντίδρασης από τα 100 μ l στα 25 μ l (Πίνακας)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ PCR	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
10x PCR Buffer	2,5 μ l
dNTPs	1 μ l
Taq DNA Polymerase	0,125 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l
Δείγμα	1 μ l
RNAse free water	18,375 μ l
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	25 μl

17.3.3. Στάδια αντίδρασης PCR

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι στην PCR (Eppendorf) και PCR (Gradient) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα (Πίνακας):

ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ (ΛΕΠΤΑ)	ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (° C)
Αρχική αποδιάταξη	3	94
Αποδιάταξη	0,5-1	94
Ένωση Primers	0,5-1	58
Επέκταση	1	72
Τελική επέκταση	10	72

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR, σχεδιάστηκαν σύμφωνα με την βάση δεδομένων NCBI Primer Blast . Τα γονίδια για τα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος ήταν τα ακόλουθα (Πίνακας):

Gene	Forward Sequence	Target Region	Reverse Sequence	Target Region	Amplicon Size
HLA-G1	AGGAGACACGGAACACCAAG	Exon 2	CCAGCAACGATACCCATGAT	Exon 5	685
HLA-G%	AACCCTCTTCCTGCTGCTCT	Exon 1	GCCTCCATCTCCCTCCTTAC	Intron 4	895
HLA-G7	AACCCTCTTCCTGCTGCTCT	Exon 1	TTACTCACTGGCCTCGCTCT	Intron 2	331
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	-	CTCCCCTCTTCAAGGGGTCT	-	244

17.4. Ηλεκτροφόρηση

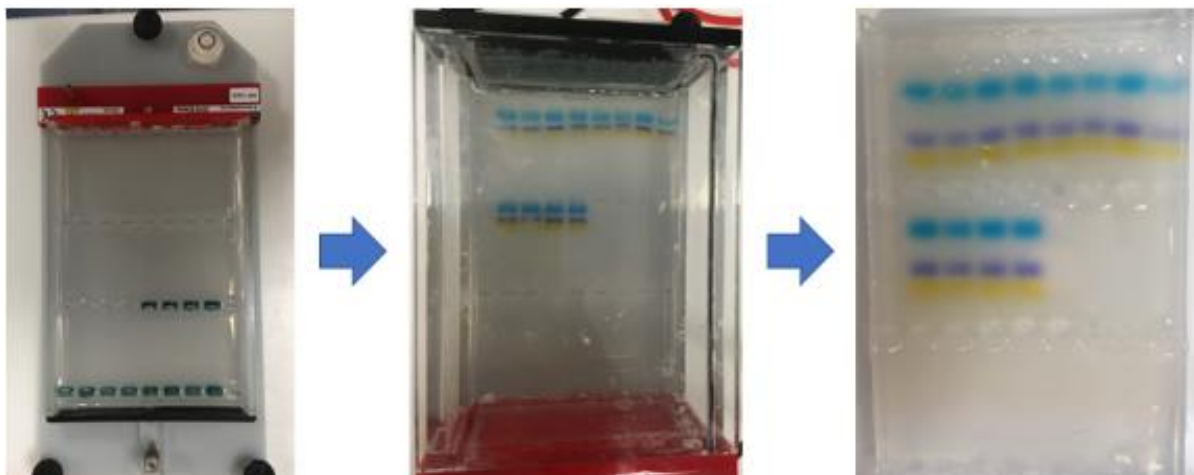
17.4.1. Υλικά και Διαλύματα

- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης (VWR International)
- Σύστημα λήψης εικόνων (Uvitec Cambridge)
- Δοχείο ηλεκτροφόρησης (VWR International)
- Κωνικός σωλήνας 200 ml (Duran)
- Ογκομετρικός κύλινδρος 500 ml (Vitalab)
- Αυτόματη πιπέτα 2-200 μ l (Gielson)
- Δείκτης μοριακού βάρους DNA (Invitrogen)
- Αγαρόζη (Sigma)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Invitrogen)
- Διάλυμα TBE 0,5% w/v

17.5. Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2% w/v: Για την παρασκευή 200 ml πηκτώματος αγαρόζης 2% w/v, απαιτήθηκαν 4 gr αγαρόζης σε 200 ml διαλύματος TBE 0,5%. Το παρόν διάλυμα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και θερμάνθηκε μέχρι πλήρης διάλυσης της αγαρόζης. Εν συνεχεία αφέθηκε να κρυώσει λίγο, προστέθηκαν 1 μ l βρωμιούχου αιθιδίου και τοποθετήθηκε στο ειδικό καλούπι, όπου και παρέμεινε μέχρι πλήρης στερεοποίησης του.

Τεχνική: Μετά το τέλος των αντιδράσεων PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v. Σε κάθε φρέατιο του πηκτώματος φορτώθηκαν από 15 μ l από το τελικό προϊόν της αντίδρασης PCR. Το συνολικό χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε



ηταν 30 λεπτά στα 140 V και 70 A . Στο τέλος της διαδικασίας, λήφθηκαν φωτογραφίες του πηκτώματος

18. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

18.1. Υλικά και Διαλύματα

- Ορθό Συνεστιακό μικροσκόπιο (LEICA SP5 II)
- culture slides (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Θρυψίνη – EDTA (Chembiotin)
- Θρεπτικό μέσο 20% FBS
- Διάλυμα φορμόλης 10% v/v (SIGMA)
- Antigen Retrieval
- Blocking Solution
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ανθρώπινου HLA-G (1:1000, Catalog MA1-10359, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Anti- Mouse IgG σημασμένο με FITC (1:100, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Διάλυμα γλυκερόλης (Sigma-Aldrich)
- DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

18.2. Πρωτόκολλο

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες με την χρήση θρυψίνης 5% όταν αυτά ήταν στο Passage 3. Στη συνέχεια ακολούθησε καταμέτρηση των κυττάρων και καλλιέργεια σε culture slides κατά προσέγγιση 1×10^4 κύτταρα και προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου. Μετά από 10 ημέρες οπού παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη της επιφάνειας των πλακών από κύτταρα ξεκίνησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Αρχικά τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν για 10 λεπτά με φορμαλδεΰδη 10% v/v και στη συνέχεια προστέθηκε antigen retrieval και blocking solution. Έπειτα ακολούθησε προσθήκη του πρώτου αντισώματος (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HLA-G, αραιώση 1:1000) και στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη του δεύτερου αντισώματος (mouse IgG , αραιώση 1:1000) οπού ήταν συζευγμένο με FITC. Τέλος έγινε προσθήκη χρωστικής DAPI ώστε να γίνουν εμφανή οι πυρήνες των κυττάρων .

19. Κυτταρομετρικός έλεγχος έναντι HLA-G

19.1. Υλικά και Διαλύματα

- Κυτταρομετρο (Beckman Coulter, Marseille, France).
- Αυτόματες πιπέτες 10-200 μl (Gilson)
- Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- BSA 1%
- Ab HLA-G (1:1000, Catalog MA1-10359, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- FITC-conjugated mouse IgG antibody (1:100, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)

19.2. Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας με Trypsin-EDTA 0,05% . Τα MSCs που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προερχόμενα από κρυοσυντηρημένο και από φρέσκο ιστό Βαρτονείου Γέλης και από στάδιο ανάπτυξης P3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων με PBS 1 x στα 500g για 6 λεπτά. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και έγινε ανασύσταση των κυττάρων με 1 ml PBS 1x και λήφθηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα των 20 μl για τη καταμέτρηση των κυττάρων με την χρωστική Trypan Blue. Για κάθε δείγμα χρειάστηκε περίπου 1×10^4 κύτταρα όπου ισομοιράστηκαν σε 14 σωληνάρια (7 για τα MSCs προερχόμενα από φρέσκο ιστό Βαρτονείου Γέλης και τα υπόλοιπα 7 για τα MSCs προερχόμενα από κρυοκαταψυγμένο ιστό) και ακολούθησε η προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το πρώτο σωληνάριο περιείχε μόνο τα κύτταρα χωρίς κανένα αντίσωμα, ενώ τα υπόλοιπα 6 περιείχαν τα κύτταρα και τα αντισώματα. Το ίδιο ακολουθήθηκε και για τα επόμενα 7 σωληνάρια όπου εξετάστηκαν τα κύτταρα από κρυοκαταψυγμένο ιστό.

Αρχικά προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα έναντι του HLA-G (10 μl / δείγμα) και πραγματοποιήθηκε επώση με αυτό για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη PBS 1 x και φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 500g για 6 λεπτά και ξανά απόρριψη του υπερκειμένου. Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος FITC-conjugated mouse IgG (10 μl / δείγμα) και πραγματοποιήθηκε επώση

για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό σημείο. Στο τέλος της επώασης προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X και όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 6 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml PBS 1X σε όλα τα σωληνάρια και vortex. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο κυτταρόμετρο.

20. Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση (MLR)

20.1. Υλικά και Διαλύματα

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (Bioair)
- Πλάκα 96 πηγαδιών (Qiagen).
- Trypsin
- A-MEM
- Mitomycin (Sigma-Aldrich)
- Ficoll Paque (Sigma-Aldrich)
- Μονάδα Αίματος Δότη A (Κύτταρα Διεγέρτες-Stimulators)
- Μονάδα Αίματος Δότη B (Κύτταρα Απα

20.2. Πρωτόκολλο MLR

Αρχικά απομονώθηκαν από δύο μονάδες αίματος δοτών λευκοκύτταρα με σταδιακές φυγοκεντρήσεις (400 g για 20 λεπτά) με την χρήση φικόλλης. Τα λευκοκύτταρα του δότη A κατέστην ως «διεγέρτες» επωάζοντάς τα με μιτομυκίνη (25μg/ml) για 10 λεπτά στους 37° C, ενώ τα λευκοκύτταρα του δότη B λειτούργησαν ως κύτταρα «απαντητές». Στην συνέχεια, MSC's προερχόμενα από μη κρυοσυντηρημένο (native) ιστό και από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα VS55, αποκολλήθηκαν με τη βοήθεια θρυψίνης και μετρήθηκαν με τη χρήση της trypan blue. Κατόπιν, προστέθηκαν 10⁵ κύτταρα/ml σε 100μl A-MEM, τοποθετήθηκαν στην πλάκα 96 πηγαδιών και παρέμειναν για περίπου 2 ώρες ώστε να επικολληθούν στην πλαστική επιφάνεια. Ακολούθως, ίσος αριθμός λευκοκυττάρων απαντητές και λευκοκυττάρων διεγερτών (10⁵ κύτταρα) επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl A-MEM και προστέθηκαν στα πηγάδια όπου είχαν προστεθεί τα MSCs (συγκαλλιέργεια). Επιπρόσθετα προστέθηκαν σε επιπλέον πηγάδια σκέτα λευκοκύτταρα (θετικό δείγμα αναφοράς) και σκέτα MSC's (αρνητικό δείγμα αναφοράς).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

1.1. Μορφολογία MSCs

Τα MSCs που απομονώθηκαν από κρυοσυντηρημένο ιστό βαρτονείου γέλης με την χρήση των διαλυμάτων Cryostor, VS55 και HMC, έκαναν την εμφάνιση τους μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας, προσκολλημένα στην επιφάνεια της πλάκας των 6 πηγαδιών (εικόνα VI-1). Μικροσκοπικά, τα MSCs προερχόμενα από τη κρυοσυντηρημένη βαρτόναιο γέλη, εμφάνισαν μορφολογία ινοβλάστη, με χαρακτηριστικές προσεκβολές, ενώ ομοίαζαν με τη μορφολογία των κυττάρων που προήλθαν από το αρνητικό δείγμα αναφοράς (φρέσκος ιστός-native). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε κάποια ανάπτυξη κυττάρων από το θετικό δείγμα αναφοράς (CPA-free), ακόμα και μετά την παρέλευση 28 ημερών σε συνθήκες καλλιέργειας. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα προερχόμενα από την 1^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης και από 3 πειραματικές συνθήκες (Cryostor, VS55, Home Made Cryostor), εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα καλλιέργειας, προσκολλημένα στην πλαστική επιφάνεια και παρουσίασαν την χαρακτηριστική μορφολογία ινοβλάστη (εικόνα VI-2, A, B, Γ). Την 18^η μέρα υπήρξε πλήρης κάλυψη της καλλιεργητικής επιφάνειας (εικόνα VI-2, Z, H, Θ). Ίδια εικόνα παρουσίασαν και τα κύτταρα των ιστών που αποψύχθηκαν την 2^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης (εικόνα VI-3) την 4^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης (εικόνα VI-4). Μετά την πλήρη κάλυψη της καλλιεργητικής επιφάνειας με MSCs (confluency), ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων και ανακαλλιέργεια σε φλάσκα 75cm².

ΠΡΩΤΗ ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

NATIVE

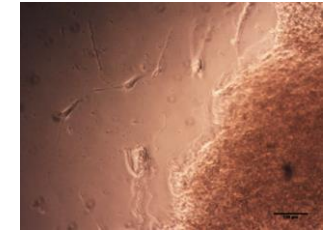
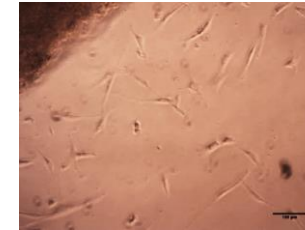
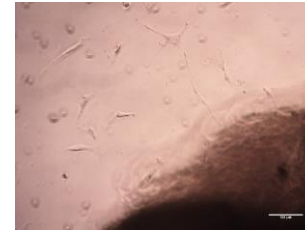
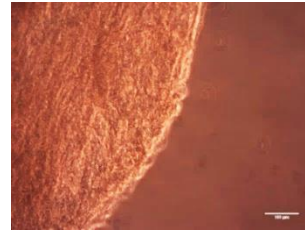
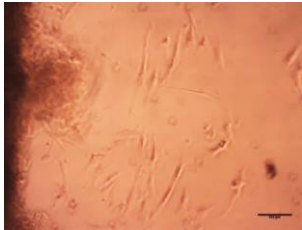
CPA-FREE

CRYOSTOR

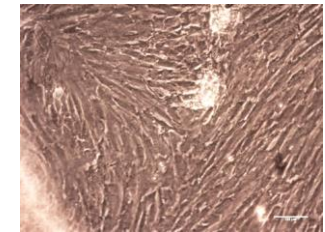
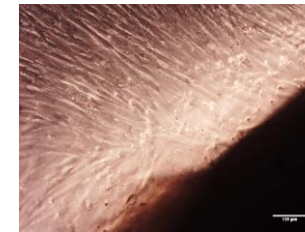
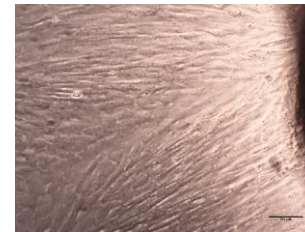
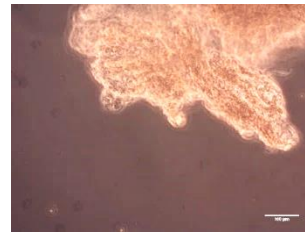
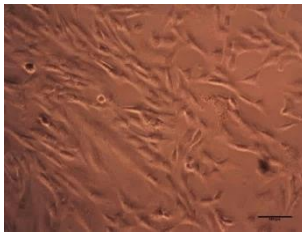
VS55

HMC

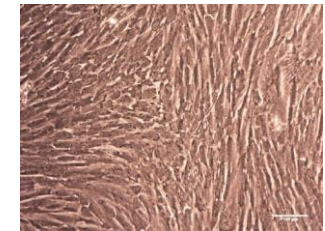
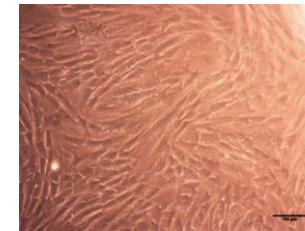
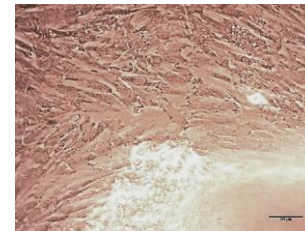
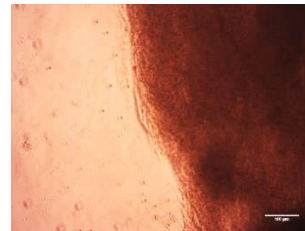
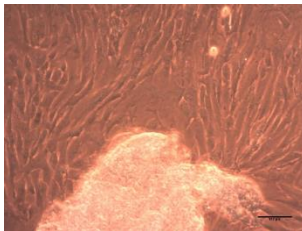
7 ημέρες
καλλιέργειας



10 ημέρες
καλλιέργειας



18 ημέρες
καλλιέργειας



Εικόνα VI-1: κυτταροκαλλιέργειες από ιστό 1 εβδομάδας κρυοσυντήρησης με τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα Cryostor, VS55, HMC. Τα πρώτα κύτταρα εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα και κατά την 18^η τα κύτταρα ήταν έτοιμα για ανακαλλιέργεια. Μεγέθυνση 10x, scale bar 100 μm.

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

NATIVE

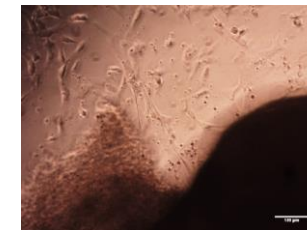
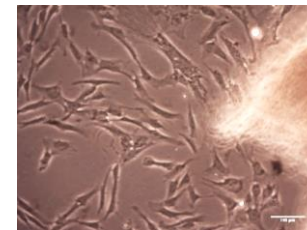
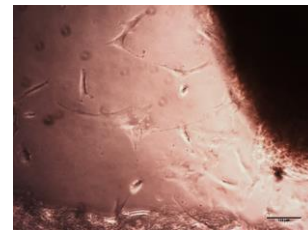
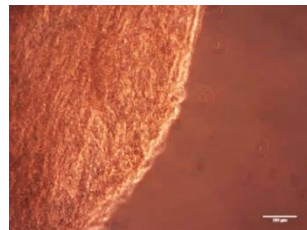
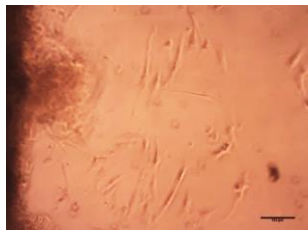
CPA-FREE

CRYOSTOR

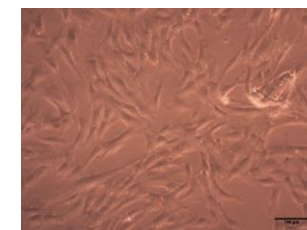
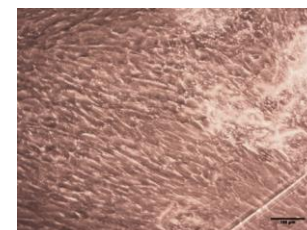
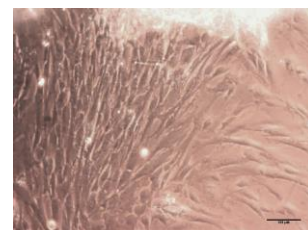
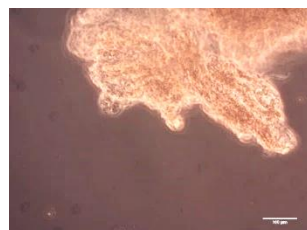
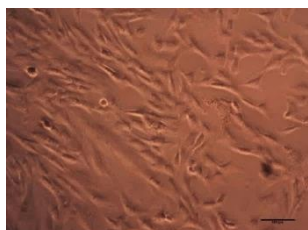
VS55

HMC

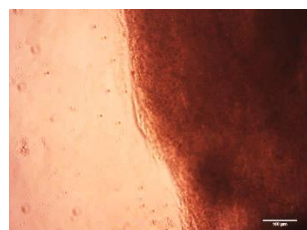
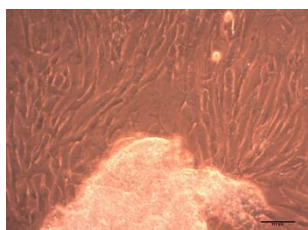
**7 ημέρες
καλλιέργειας**



**10 ημέρες
καλλιέργειας**

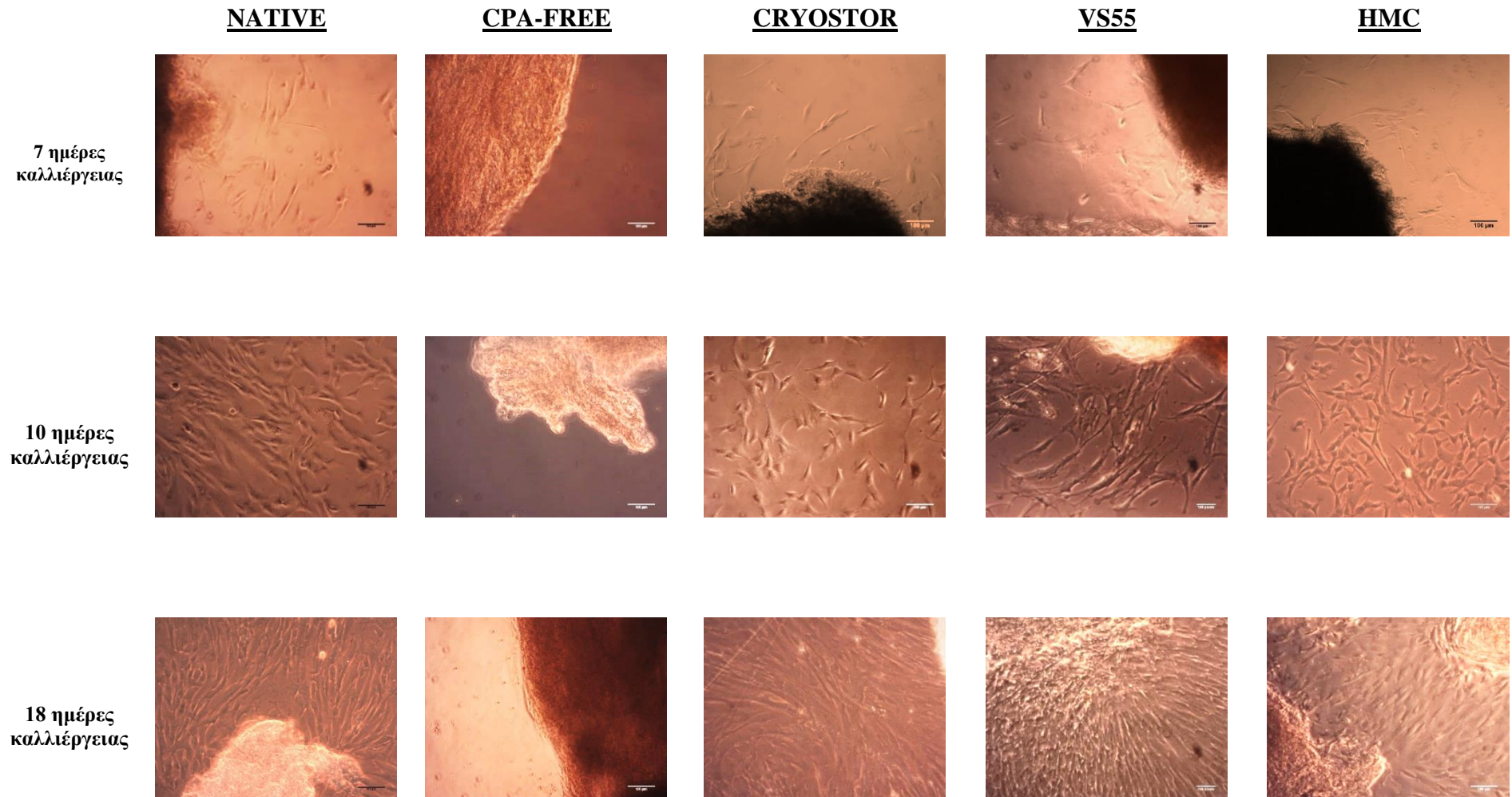


**18 ημέρες
καλλιέργειας**



Εικόνα VI-2: κυτταροκαλλιέργειες από ιστό 2 εβδομάδων κρυοσυντήρησης με τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα Cryostor, VS55, HMC. Τα πρώτα κύτταρα εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα και κατά την 18^η τα κύτταρα ήταν έτοιμα για ανακαλλιέργεια. Μεγέθυνση 10x, scale bar 100 μm

ΤΕΤΑΡΤΗ ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

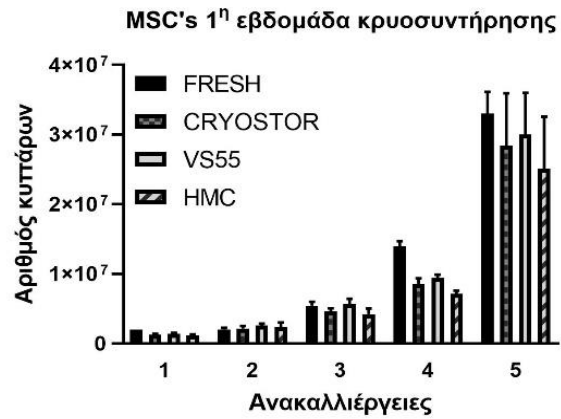


Εικόνα VI-3: κυτταροκαλλιέργειες από ιστό 4 εβδομάδων κρυοσυντήρησης με τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα Cryostor, VS55, HMC. Τα πρώτα κύτταρα εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα και κατά την 18^η τα κύτταρα ήταν έτοιμα για ανακαλλιέργεια. Μεγέθυνση 10x, scale bar 100 μm.

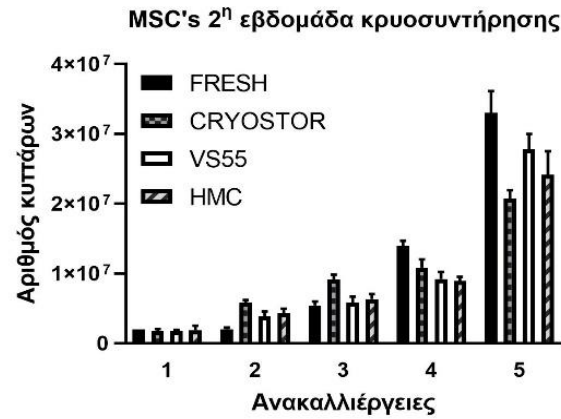
2. Ρυθμός Πολλαπλασιασμού και Ζωτικότητα Κυττάρων

Εκτιμήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η ζωτικότητα των MSCs μετά από κάθε ανακαλλιέργεια. Στην συνέχεια, τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με εκείνα του αρνητικού δείγματος αναφοράς. Οι μετρήσεις από τις ανακαλλιέργειες των κυττάρων προερχόμενων από κρυοσυντηρημένο ιστό, έδειξαν σημαντικό αριθμό απόκτησης κυττάρων και από τις 3 εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Αναλυτικότερα, ο ιστός της 1^{ης} εβδομάδας κρυοσυντήρησης (και με τα τρία κρυοπροστατευτικά διαλύματα), εμφάνισε υψηλό αριθμό παραγωγής κυττάρων και πιο συγκεκριμένα, ο ιστός που κρυοσυντηρήθηκε με το κρυοπροστατευτικό διάλυμα VS55, παρουσίασε την υψηλότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα διαλύματα (εικόνα VI-5, A). Παρομοίως, ο αριθμός των κυττάρων από τους ιστούς της 2^{ης} και την 4^{ης} εβδομάδα κρυοσυντήρησης ήταν αρκετά αυξημένος, με την μόνη διαφορά ότι τα κύτταρα του ιστού που κρυοσυντηρήθηκε με το διάλυμα Cryostor έδειξαν ένα πιο αυξημένο προφίλ πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τις άλλες δυο κατηγορίες. Από την άλλη πλευρά, η ζωτικότητα των κυττάρων παρέμεινε σε υψηλά ποσοστά (>85%) παρά τον χρόνο παραμονής του ιστού στο υγρό άζωτο. Συγκεκριμένα, ο ιστός της 1^{ης} εβδομάδας κρυοσυντήρησης με την χρήση του διαλύματος HMC, είχε υψηλή ζωτικότητα στα κύτταρα που απέδωσε, με ποσοστά >90% , στην 2^η και την 4^η ανακαλλιέργεια και ζωτικότητα 85% στην 5^η κυτταροκαλλιέργεια. Ο ιστός που κρυοσυντηρήθηκε με το Cryostor παρουσίασε ομοίως υψηλά ποσοστά ζωτικότητας κυττάρων, με ποσοστά >90% στην 2^η και >85% στην και 3^η ανακαλλιέργεια. Ο ιστός που κρυοσυντηρήθηκε με το διάλυμα VS55, παρουσίασε σταθερά ποσοστά ζωτικότητας >90%. Μια μικρή πτώση του ποσοστού ζωτικότητας παρατηρήθηκε στα κύτταρα των ιστών 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας κρυοσυντήρησης, αλλά σε καμία από τις 3 πειραματικές συνθήκες το ποσοστό ζωτικότητας των κυττάρων δεν ήταν μικρότερο από το 80% (εικόνα VI-5, Δ, Ε, ΣΤ).

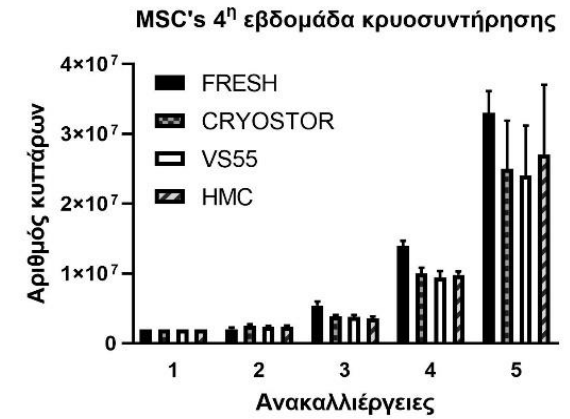
A.



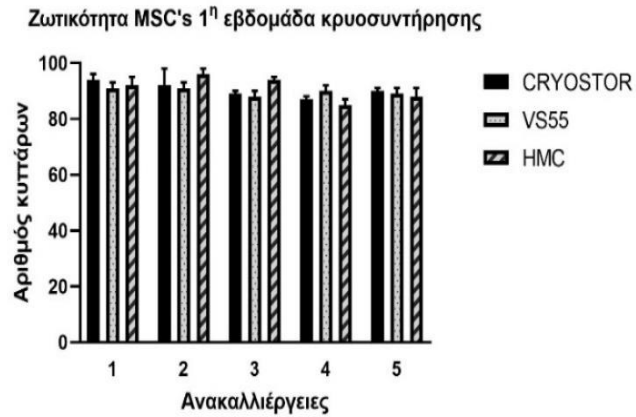
B.



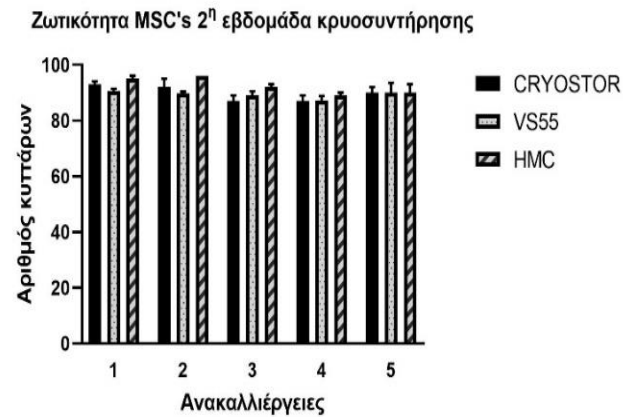
Γ.



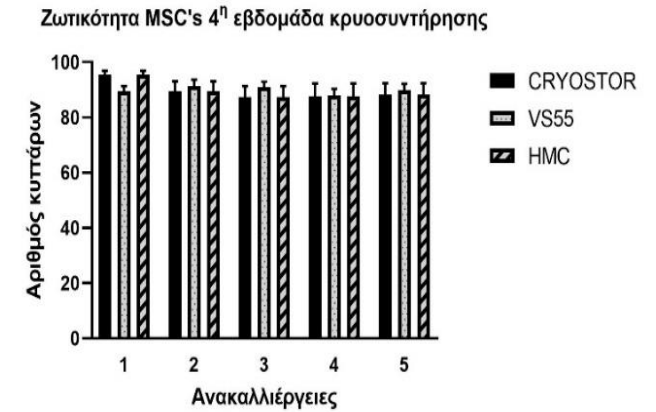
Δ.



Ε.



ΣΤ.



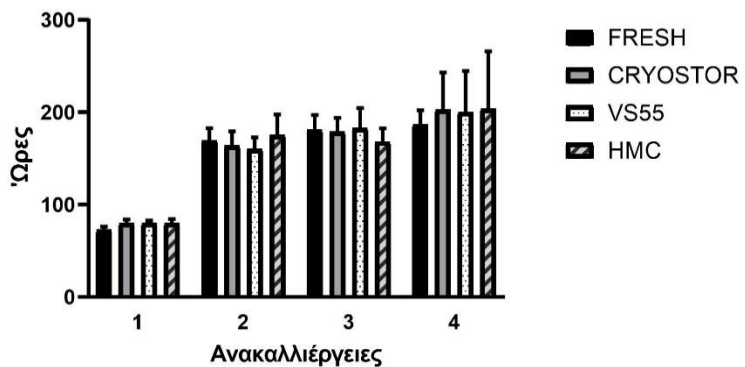
Εικόνα VI-5: Ανακαλλιέργειες των MSC's της πρώτης (Α), δεύτερης (Β) και τέταρτης (Γ) εβδομάδας κρυσσυντήρησης. Ζωτικότητα των MSC's της πρώτης εβδομάδας κρυσσυντήρησης (Δ), δεύτερης (Ε) και τέταρτης (ΣΤ) εβδομάδας κρυσσυντήρησης.

3. Ρυθμός Πολλαπλασιασμού MSCs

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού προσδιορίστηκε με την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, πριν από κάθε ανακαλλιέργεια και έπειτα υπολογίστηκε το CDT (βλ. κεφάλαιο V, σελ 49-50. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε ώρες. Πιο ειδικά, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού όλων των ιστών, ανεξαρτήτως διάρκειας αποθήκευσης, φάνηκε να έχει ανοδική πορεία ενώ παρατηρήθηκε ότι κατά την τέταρτη ανακαλλιέργεια ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (σε ώρες) των κρυοσυντηρημένων κυττάρων άρχισε να υπερβίνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του δείγματος αναφοράς («φρέσκος» ιστός) (εικόνα VI-6, A, B, Γ)

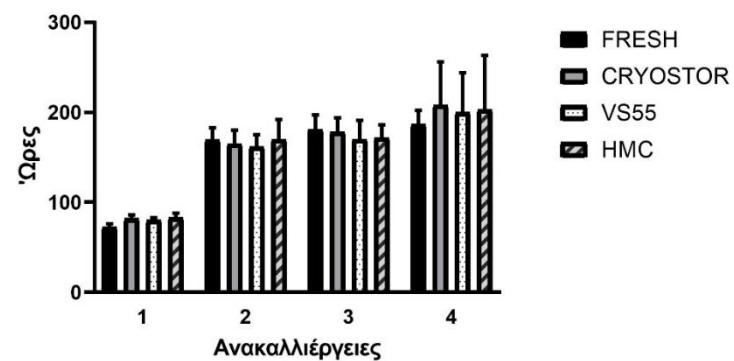
A.

Ρυθμός πολλαπλασιασμού 1^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης



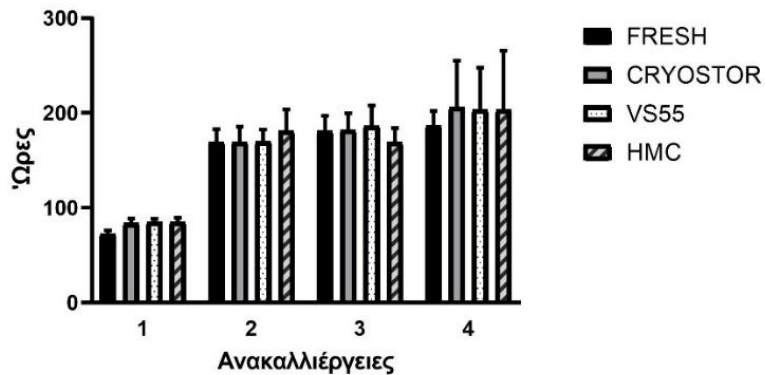
B.

Ρυθμός πολλαπλασιασμού 2^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης



Γ.

Ρυθμός πολλαπλασιασμού 4^η εβδομάδα κρυοσυντήρησης



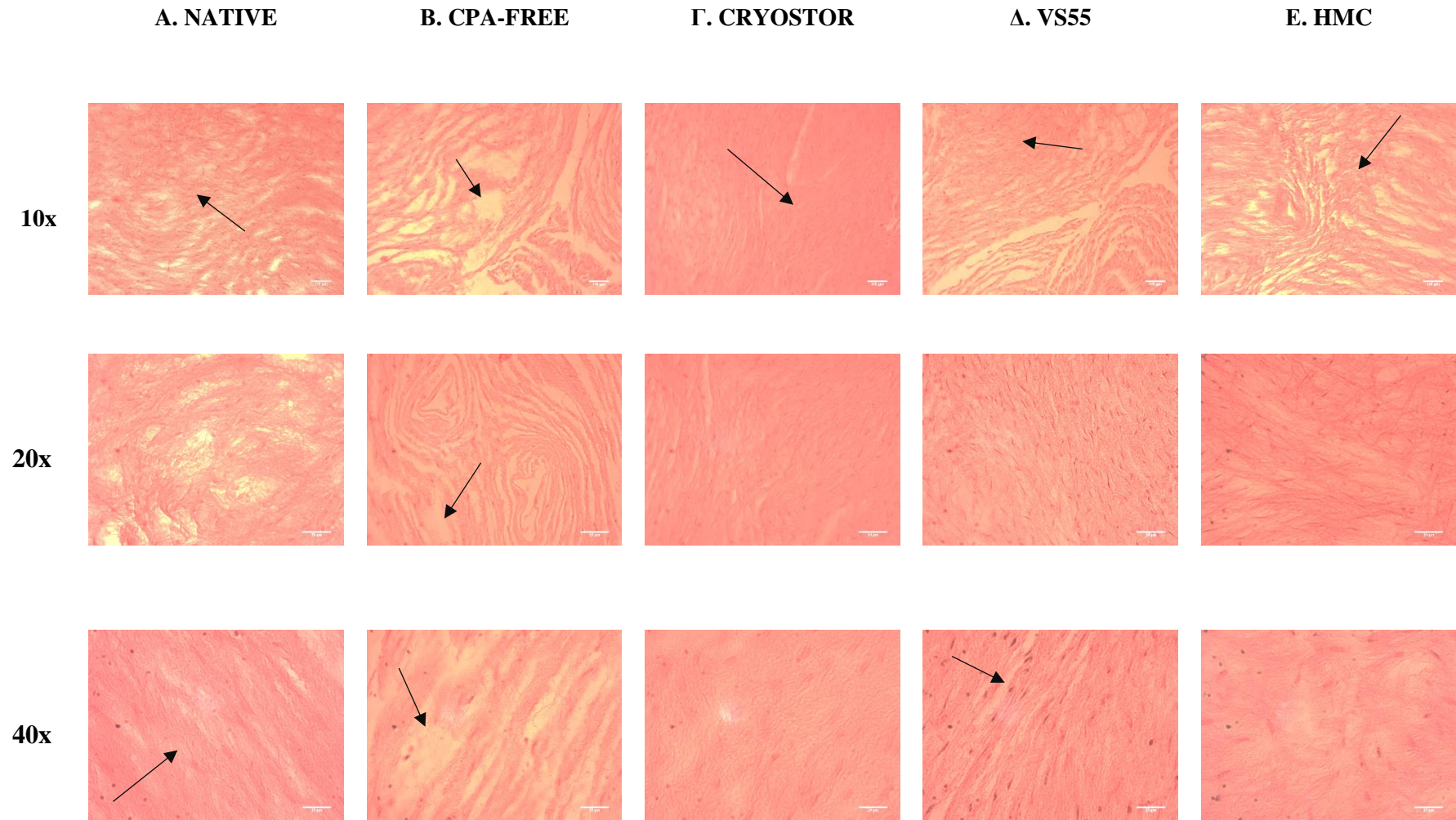
Εικόνα VI-6: Ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSCs (1^η εβδομάδας κρυοσυντηρημένου ιστού) σε ώρες. Την υψηλότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα την παρουσίασαν κύτταρα κρυοσυντηρημένα με Cryostor ενώ την χαμηλότερη κύτταρα κρυοσυντηρημένα με HMC. Συγκριτική εικόνα του ρυθμού πολλαπλασιασμού από τα κύτταρα 1^η, 2^η και 4^η εβδομάδας.

4. Ιστολογική Ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε ιστολογικός έλεγχος των κρυσυντηρημένων ιστοτεμαχίων της βαρτονείου γέλης, με σκοπό την μελέτη επίδρασης των μεθόδων κρυσυντήρησης που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη. Η αξιολόγηση της δομής της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΚΟ) των ιστοτεμαχίων διενεργήθηκε με την χρώση της Η&Ε. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε η χρώση της Sirius Red για την μελέτη του κολλαγόνου.

4.1. Αιματοξυλίνη- Ηωσίνη (Η&Ε)

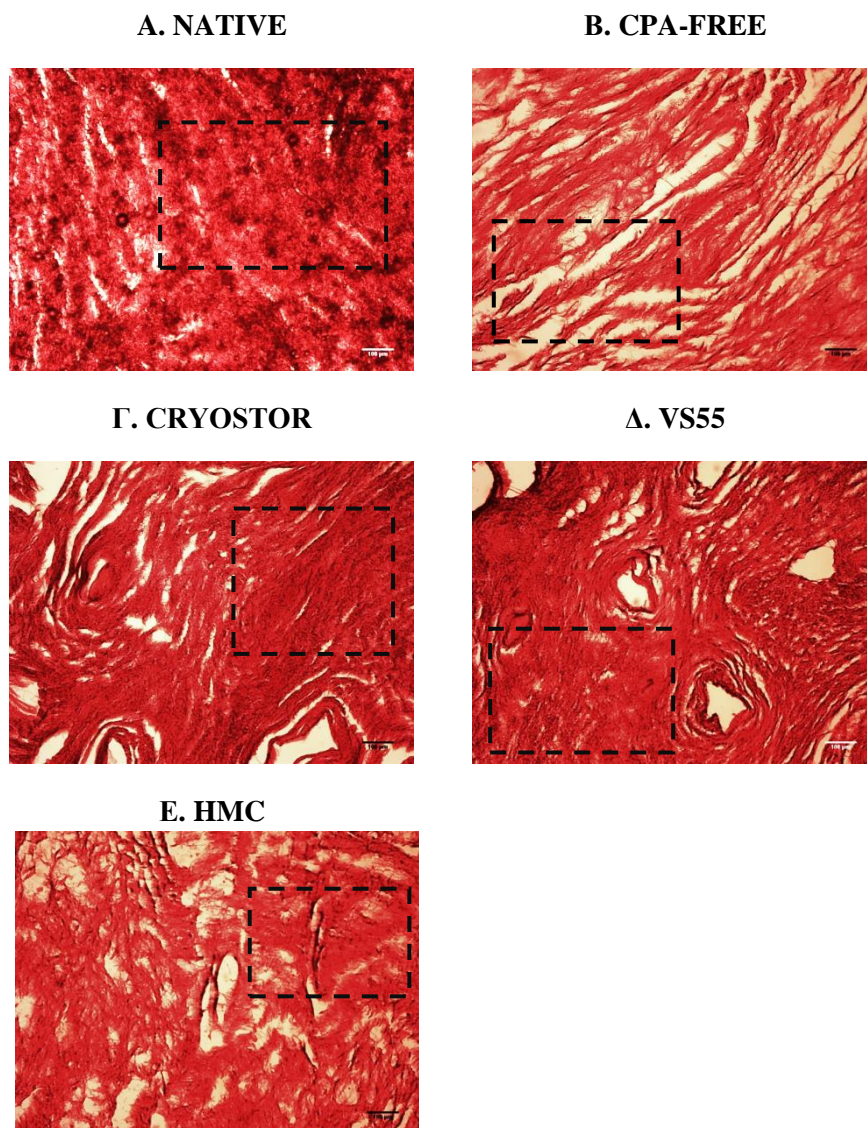
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης χρώσης, παρατηρήθηκε διατήρηση των στοιχείων της ΕΚΟ του ιστού. Ειδικότερα, τα δείγματα που δεν είχαν υποστεί καμία μέθοδο κρυσυντήρησης χαρακτηρίστηκαν από διατήρηση της δομής του ιστού και εμφανή κυτταρικούς πληθυσμούς (εικόνα VI-7, Α). Παρόμοια εικόνα, με ικανοποιητική διατήρηση της ΕΚΟ αλλά και της πυκνότητας, εμφάνιστηκαν οι ιστοί που κρυσυντηρήθηκαν με τα διαλύματα Cryostor και VS55 και HMC (εικόνα VI-7, Γ, Δ, Ε). Αντίθετα οι αποθηκευμένοι ιστοί χωρίς την χρήση κρυοπροστατευτικού διαλύματος χαρακτηρίστηκαν από εκτεταμένη καταστροφή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του ιστού (εικόνα VI-7, Β). Η καταστροφή αυτή του ιστού αποδίδεται κυρίως στην ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου κατά τη διαδικασία της κρυσυντήρησης αλλά και κατά την απόψυξη των ιστών.



Εικόνα VI-7: Βαρτόνιος γέλη βαμμένη με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης. Στις εικόνες A – B είναι το αρνητικό δείγμα αναφοράς (native tissue) και θετικό δείγμα αναφοράς (CPA-FREE tissue) αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε αραίωση στην πυκνότητα του ιστού σε μεγαλύτερο βαθμό στον κρυοσυντηρημένο ιστό με VS55 (Δ), και σε μικρότερο βαθμό στον κρυοσυντηρημένο ιστό με HMC , 10x, scale bar 100μm.

4.2. Sirius Red

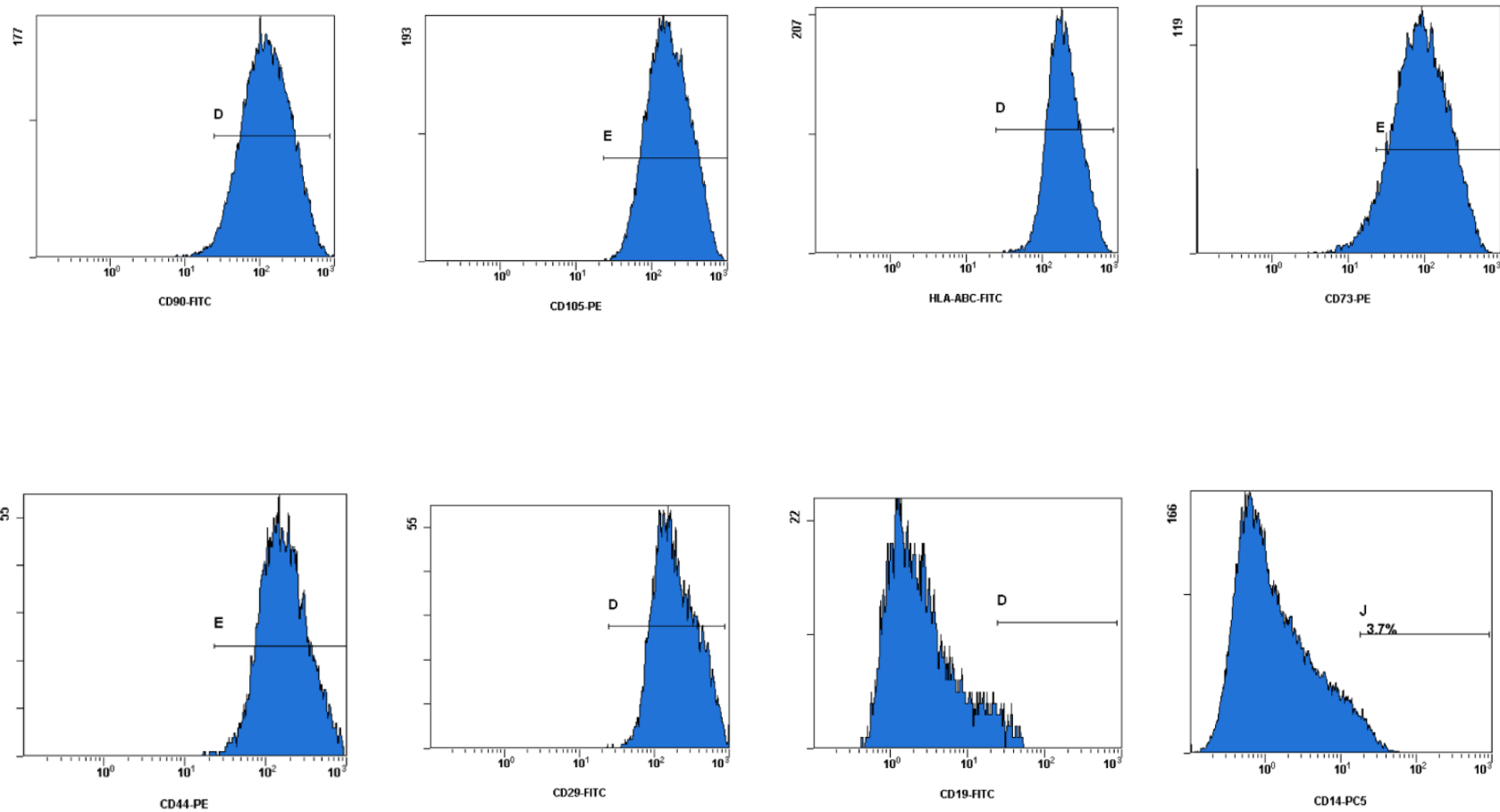
Πραγματοποιήθηκε χρώση των ιστών της βαρτονείου ξέλης με την Sirius Red για περαιτέρω αξιολόγηση της δομής και της οργάνωσης του κολλαγόνου στα υπό μελέτη δείγματα μετά την επίπτωση των κρυοπροστατευτικών μέσων. Ως αρνητικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε φρέσκος ιστός (native) και για θετικό δείγμα αναφοράς CPA-FREE ιστός (εικόνα VI-8, A, B). Οι κρυοσυντηρημένοι ιστοί έδειξαν επαρκή διατήρηση των ιών κολλαγόνου σε σύγκριση με τον CPA-free ιστό (εικόνα VI-8, B, Γ, Δ, E).



Εικόνα VI-8: Βαρτόνειος γέλη βαμμένη με χρώση Sirius Red. Στις εικόνες A – B είναι το αρνητικό δείγμα αναφοράς (native tissue) και θετικό δείγμα αναφοράς (CPA-FREE tissue) αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ένταση στη χρώση στους κρυοσυντηρημένους ιστούς με CRYOSTOR και VS55 (Γ-Δ) ενώ ο κρυοσυντηρημένος ιστός με HMC (E) παρουσίασε μία εικόνα πιο συναφή με το θετικό δείγμα αναφοράς, 10x, scale bar 100μm..

5. Προσδιορισμός Επιφανειακών Δεικτών - Ανοσοφαινότυπος

Κατά τον κυτταρομετρικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία ελήφθησαν στο τέλος της 3^{ης} ανακαλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν MSCs προερχόμενα από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα VS55. Από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας φάνηκε ότι τα MSCs παρουσίασαν μικρή έως καθόλου έκφραση (<0,3%) στους δείκτες CD3, CD19, CD31, CD34, CD45 και CD62. Αντίθετα, όσον αφορά τους χαρακτηριστικούς δείκτες των MSCs, CD29, CD73, CD90 και CD105 παρουσίασαν υψηλή έκφραση σε ποσοστά >95% (εικόνα VI-16) .

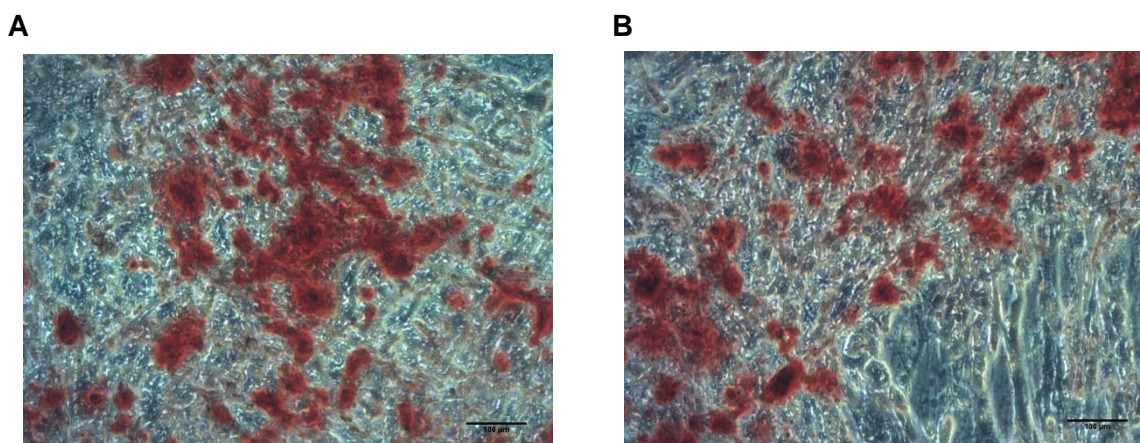


Εικόνα VI-9: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής από ναλοποιημένα MSCs (3^{15} ανακαλλιέργειας) για CD90, CD105, HLA-ABC, CD73, CD44, CD29, CD19 και CD14.

6. Ελεγχόμενη *in vitro* Διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων

6.1. Οστεοκύτταρα

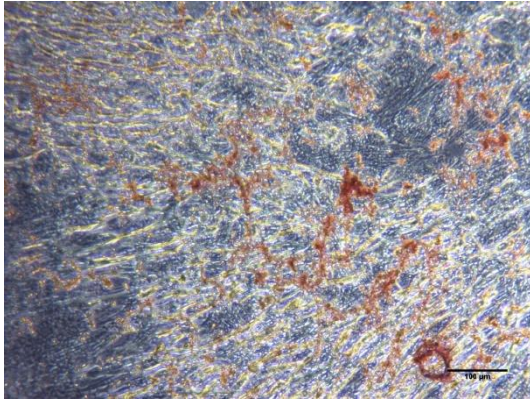
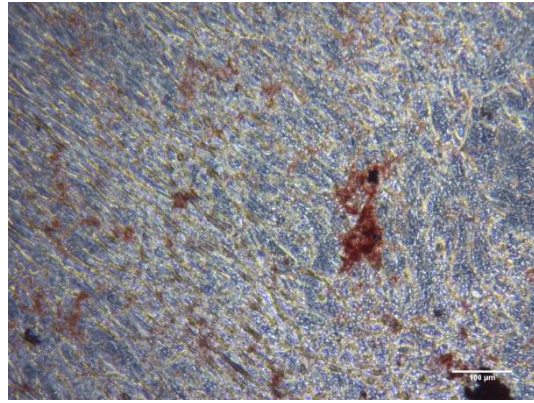
Για την διαφοροποίηση των MSCs στην οστική κυτταρική σειρά ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για κάθε φρεάτιο ήταν 5×10^4 κύτταρα. Το διαφοροποιητικό υλικό (Osteogenic Medium) αλλάζοταν κάθε 4 ημέρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο και η συγκεκριμένη διαδικασία διήρκεσε 30 ημέρες. Ακολούθησε η διεξαγωγή των χρώσεων Alizarin Red-S για την πιστοποίηση της επιτυχούς διαφοροποίησης των MSCs στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Εικόνα VI-10). Τα MSCs με επιτυχία ανέπτυξαν αποθέσεις ασβεστίου όπως φάνηκε με την χρώση Alizarin Red S.



Εικόνα VI-10: Οστεογενή διαφοροποίηση των MSC's με την χρώση Alizarin Red S. A) Διαφοροποιημένα MSC's από μη κρυοσυντηρημένο ιστό (αρνητικό δείγμα αναφοράς), B) Διαφοροποιημένα MSC's από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα κρυοσυντήρησης VS55. 10x, scale bar 100μm.

6.2. Λιποκύτταρα

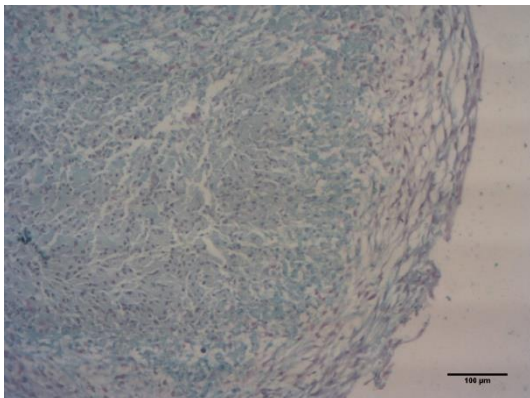
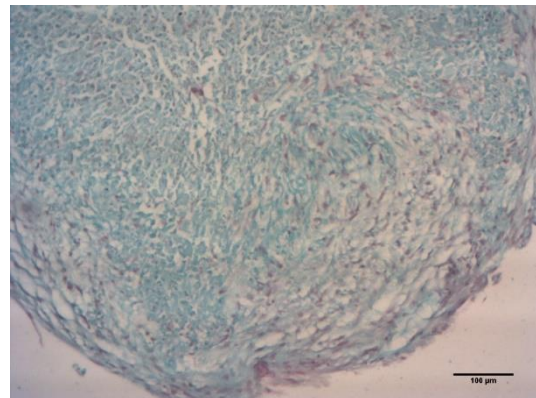
Για να πραγματοποιηθεί η διαφοροποίηση των MSC σε λιποκύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν 5×10^4 κύτταρα/φρεάτιο. Η διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες των 6 πηγαδιών και το διαφοροποιητικό υλικό (Adipogenic Medium) αλλάζοταν κάθε 4 ημέρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3×10^5 κύτταρα και το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε ήταν 30 ημέρες. Τέλος ακολούθησε η χρώση των λιποκυττάρων με την χρωστική Oil-Red-O, η οποία βάφει τα κενοειδή λιπιδίων υπό συνθήκες λιπογενής επαγωγής. (Εικόνα VI-11)

A**B**

Εικόνα VI-11: Λιπογενή διαφοροποίηση των MSC's με την χρώση Oil Red O. A) Διαφοροποιημένα MSC's από μη κρυοσυντηρημένο ιστό (αρνητικό δείγμα αναφοράς), B) Διαφοροποιημένα MSC's από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα κρυοσυντήρησης VS55. 10x, scale bar 100μm.

6.3. Χονδροκύτταρα

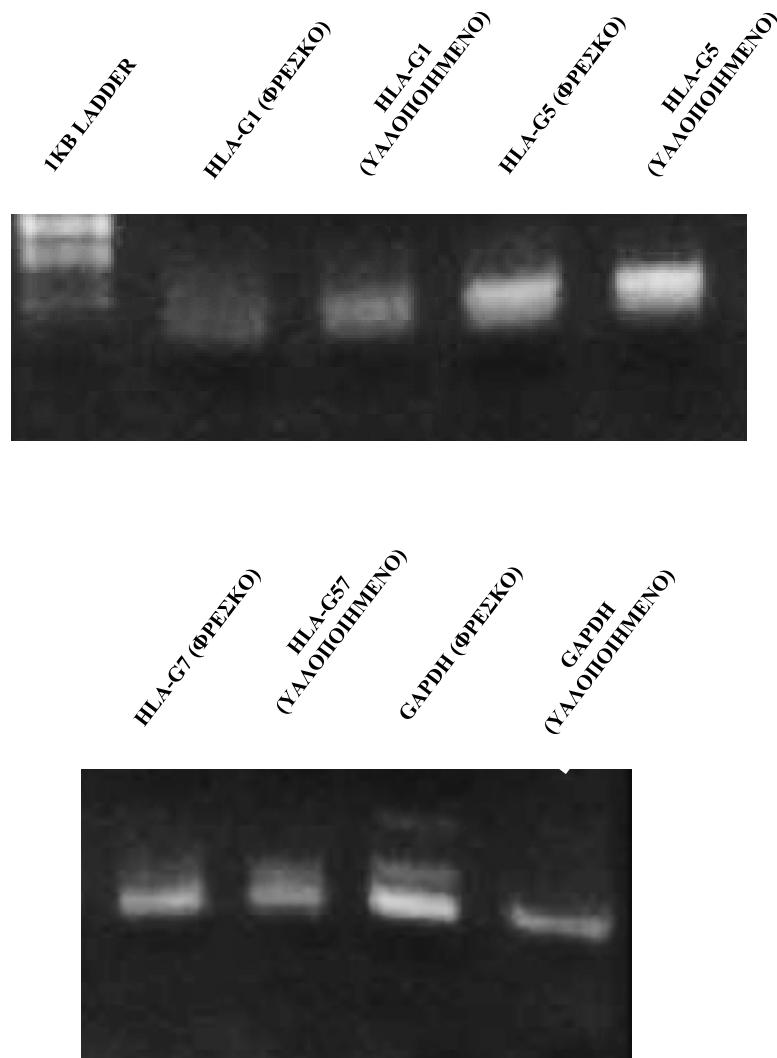
Η διαφοροποίηση των MSC σε χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε στο ίζημα των κυττάρων που λήφθηκε ύστερα από φυγοκέντρηση στις 500 rpm για 6 λεπτά σε falcon 15 ml. Ακολούθησε ιστολογική τεχνική του ιζήματος και χρώση των τομών με Toluidine Blue και Αιματοξυλίνη-Εωσίνη. Όπως φαίνεται και στην εικόνα VI-12 υπό συνθήκες χονδρογενής επαγωγής, τα MSCs κατάφεραν να παράγουν θεϊκές γλυκοζαμινογλυκάνες, βασικά μακρομόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του χόνδρου, υποδεικνύοντας την επιτυχή διαφοροποίηση προς την χονδρογενή σειρά.

A**B**

Εικόνα VI-12: Χονδρογενή διαφοροποίηση των MSC's με την χρώση Toluidine blue. A) Διαφοροποιημένα MSC's από μη κρυοσυντηρημένο ιστό (αρνητικό δείγμα αναφοράς), B) Διαφοροποιημένα MSC's από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα κρυοσυντήρησης VS55. 10x, scale bar 100μm.

7. Μοριακός Έλεγχος Μεσεγχυματικών Στελεχειαίων Κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού m-RNA από κύτταρα φρέσκου και υαλοποιημένου ιστού και στη συνέχεια ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) για τη δημιουργία c-DNA. Ακολούθησε PCR με τους κατάλληλους εκκινητές για τα γονίδια HLA-G1, G5, G7, και έπειτα ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης το γονίδιο του HLA-G και οι διαλυτές και οι μεμβρανικές ισομορφές του εκφράζονται από τα μη κρυοσυντηρημένα αλλά και από τα υαλοποιημένα κύτταρα (Εικόνα VI-13)



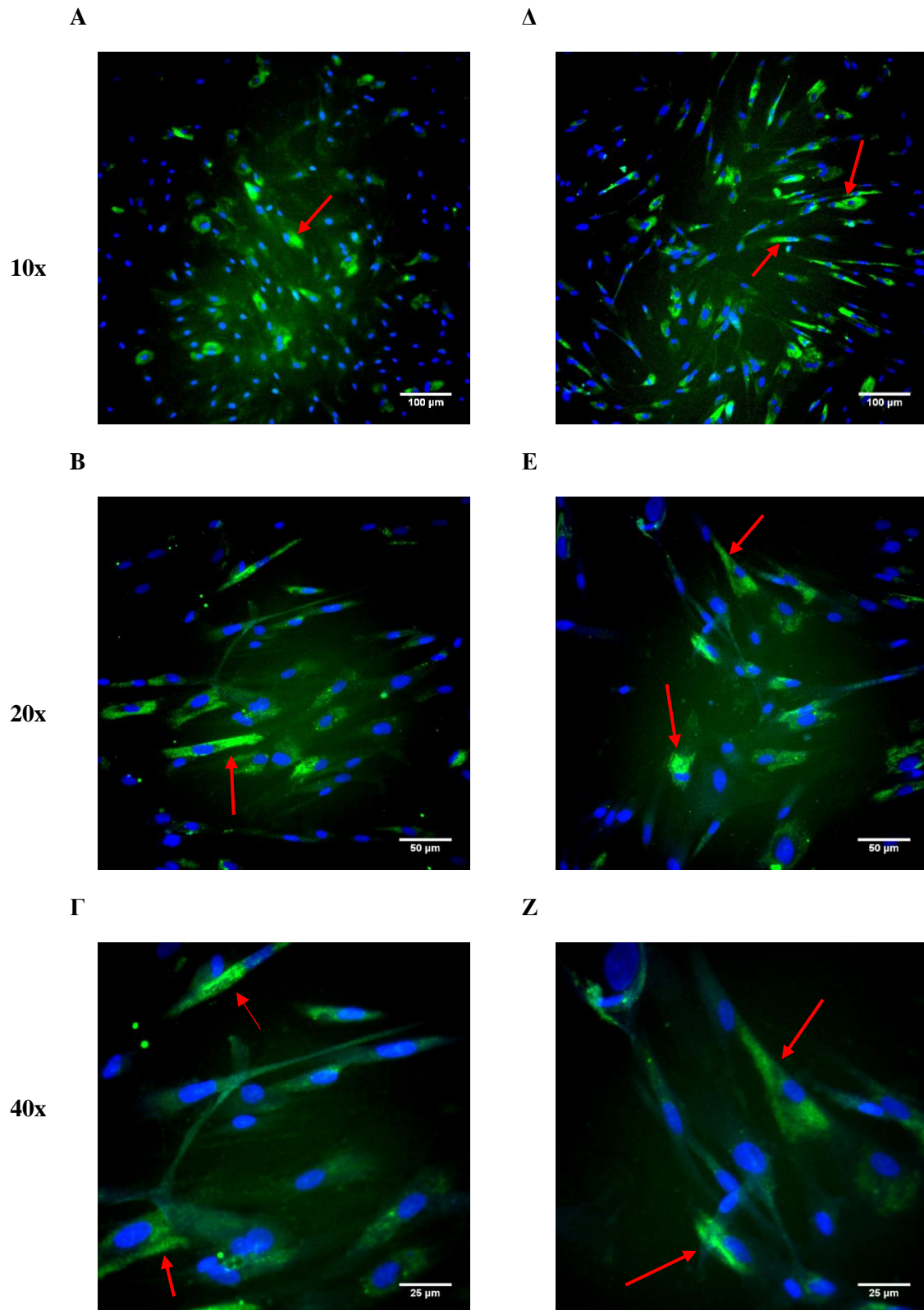
Εικόνα VI-13: Γονιδιακή έκφραση του HLA-G. Παρατηρείται ίδια έκφραση του γονιδίου και από τα MSCs κρυοσυντηρημένου ιστού (CPA:Cryostor) και από τα MSCs φρέσκου ιστού.

8. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Περαιτέρω αξιολόγηση για τη πιστοποίηση της έκφρασης του HLA-G από τα MSCs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού σύμφωνα με τις τεχνικές που αναλύθηκαν παραπάνω. Η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σε κύτταρα 3^{ης} ανακαλλιέργειας, προερχόμενα από μη κρυοσυντηρημένο (native) ιστό (εικόνα VI-14, Α, Β, Γ) και κύτταρα από ιστό κρυοσυντηρημένο με το διάλυμα VS55 (εικόνα VI-14, Δ, Ε, Ζ). Τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν την θετική έκφραση του HLA-G και από τις δύο πειραματικές διαδικασίες.

NATIVE MSCs

VITRIFIED MSCs



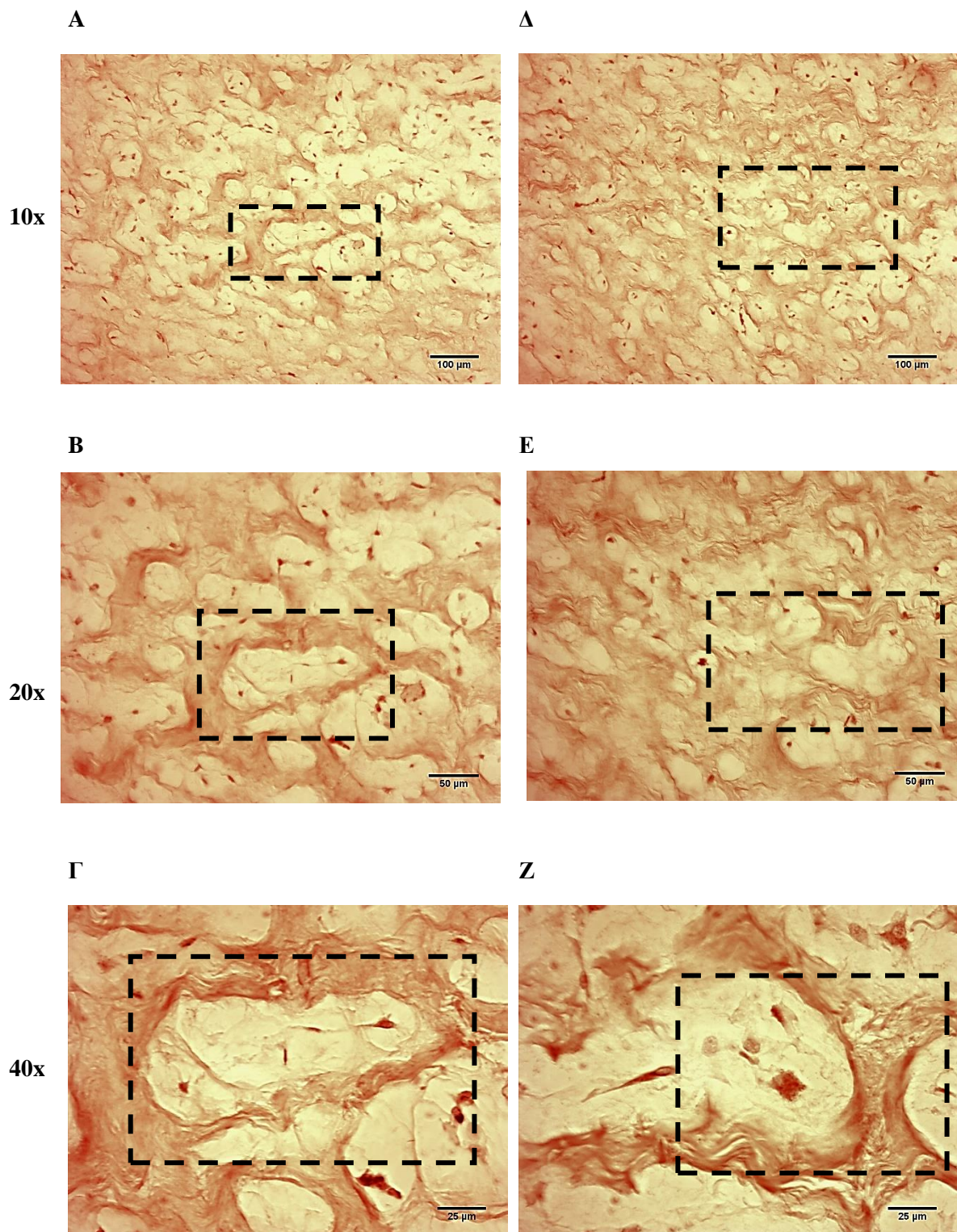
Εικόνα VI-14: Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κυτταροκαλλιέργειες από κύτταρα προερχόμενα από μη κρυοσυντηρημένο ιστό (native) στις εικόνες A, B, Γ και σε κύτταρα προερχόμενα από κρυοσυντηρημένο ιστό με διάλυμα κρυοσυντήρησης HMC. A, Δ 10x, scale bar 100μm, B, E 20x, scale bar 50μm, Γ, Z 40x, scale bar 25μm.

9. Ανοσοϊστοχημεία

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας για την περαιτέρω αξιολόγηση διερεύνηση της έκφρασης του HLA-G από τον μη κρυοσυντηρημένο ιστό (native) και από ιστό κρυοσυντηρημένο με το διάλυμα VS55. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναλύθηκε παραπάνω, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημεία έναντι του HLA-G. Τα αποτελέσματα έδειξαν επιτυχή πρόσδεση του αντισώματος στους αντιγονικούς επιτόπους του HLA-G και στις δυο πειραματικές συνθήκες. Αναλυτικότερα, η πρόσδεση του αντισώματος είναι εμφανής στον μη κρυοσυντηρημένο (native) ιστό (εικόνα VI-15, A, B, Γ). Παράλληλα, παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στον ιστό όπου είχε κρυοσυντηρηθεί με το διάλυμα VS55 (εικόνα VI-15, Δ, E, Z). Το αποτέλεσμα αυτό πιβεβαιώνει την διατήρηση έκφρασης του HLA-G από τον ιστό της Βαρτονείου Γέλης ενώ έχει υποστεί α) κρυοσυντήρηση με την μέθοδο της υαλοποίησης και β) την διαδικασία της απόψυξης.

NATIVE TISSUE

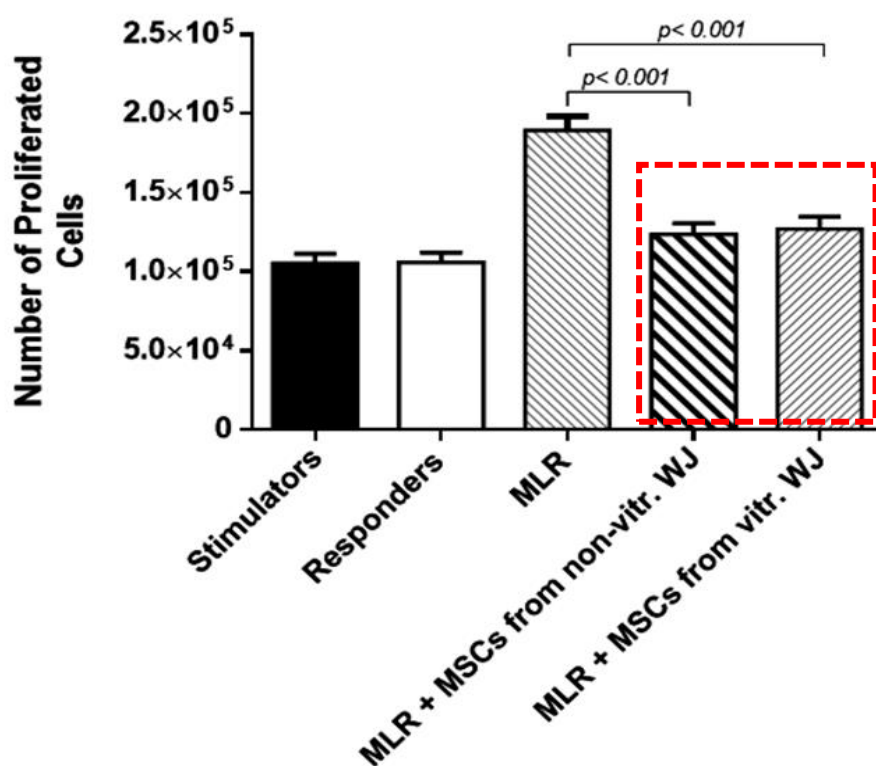
VITRIFIED TISSUE



Εικόνα VI-15: Ανοσοϊστοχημεία σε μη κρυσταλλωμένο ιστό βαρτονίου γέλης (native) στις εικόνες Α, Β, Γ και σε κρυσταλλωμένο ιστό βαρτονίου γέλης με το διάλυμα κρυσταλλώσεως HMC. Α, Δ 10x, scale bar 100μm, Β, Ε 20x, scale bar 50μm, Γ, Ζ 40x, scale bar 25μm..

10. Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση (MLR)

Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία της μικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης για να ελεγχθούν οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των MSCs. Αναλυτικότερα, τα PBMCs των δυο δοτών (κυτταρα διεγέρτες και κύτταρα απαντητές) παρουσίασαν αύξηση του ολικού αριθμού των κυττάρων απαντητών το οποίο πιθανά δηλώνει την αλλοαναγνώριση και την ανοσο-ανταπόκριση. Παράλληλα, στη συγκαλλιέργεια των PBMCs (κυττάρων διεγέρτες και απαντητές) με τα MSC's παρουσιάστηκε σημαντική μείωση των κυττάρων απαντητών. Πιο ειδικά, μετά από 7 ημέρες συγκαλλιέργειας των ενεργοποιημένων PBMCs με MSC's απομονωμένα από μη υαλοποιημένο ιστό (native) και με MSC's απομονωμένα από κρυοσυντηρημένο ιστό με το διάλυμα VS55, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των PBMCs απαντητών. Το αποτέλεσμα αυτό μας επιβεβαιώνει α) τις γενικές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες που ασκούν τα MSC's στα δραστικά T κύτταρα και β) τα MSC's εξακολουθούν να κατέχουν τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και μετά την διαδικασία της κρυοσυντήρησης με την μέθοδο της υαλοποίησης, και μετά την απόψυξή τους (εικόνα VI-16).



Εικόνα VI-16: Μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR) χρησιμοποιώντας MSCs από μη κρυοσυντηρημένο ιστό και από υαλοποιημένο ιστό. Παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στην MLR και στην MLR όπου συν-καλλιεργήθηκαν MSCs προερχόμενα από μη κρυοσυντηρημένο ιστό ($p=0.001$) και στην MLR όπου συν-καλλιεργήθηκαν MSCs προερχόμενα από υαλοποιημένο ιστό ($p=0.001$)

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα MSCs έχουν προκαλέσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων που κατέχουν, δηλαδή την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε τουλάχιστον τρεις κυτταρικές σειρές, καθώς και τις ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους, τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στην αναγεννητική ιατρική για την ανάπλαση ιστών, καθώς και στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο συστηματικός ερυθρματώδης λύκος, η σκλήρυνση κατά πλάκας αλλά και η νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GvHD). Οι ιδιότητές τους αυτές καθιστούν τα MSCs ιδανικά για τη χρήση σε εξατομικευμένες θεραπείες. Κύρια πηγή απομόνωσης MSCs από ενήλικους οργανισμούς είναι ο μυέος των οστών και ο λιπώδης ιστός, όπου για την απόκτηση των κυττάρων είναι αναγκαία η χειρουργική επέμβαση. Τα τελευταία χρόνια, η βαρτόνειος γέλη του ομφαλίου λώρου αποτελεί μια ευρήτατα χρησιμοποιούμενη πηγή για την απομόνωση MSCs. Ένα μείζον πρόβλημα στις κυτταρικές θεραπείες είναι ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που απαιτείται. Εκτιμάται ότι περίπου περισσότερα από 1×10^3 MSCs απαιτούνται για τις περισσότερες κυτταρικές θεραπείες, περιλαμβανομένου την σκλήρυνση κατά πλάκας, ALS κα. Για να αποκτηθεί ένας επαρκής αριθμός κυττάρων, είναι απαραίτητες οι παρατεταμένες κυτταρικές καλλιέργειες, οι οποίες μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στις ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες των MSCs. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι ίσως η εφαρμογή μιας αποτελεσματικής μεθόδου κρυοσυντήρησης. Μολονότι η κρυοσυντήρηση των κυττάρων θεωρείται ευκολότερη διαδικασία, αντίθετα η κρυοσυντήρηση ιστών και οργάνων είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία.

Επί του παρόντος, οι συμβατικές μέθοδοι κρυοσυντήρησης είναι πολύ δύσκολο να εφαρμοστούν για την σωστή αποθήκευση του ιστού της βαρτονείου γέλης σε χαμηλές θερμοκρασίες [140] ενώ μέχρι σήμερα, αρκετές προσπάθειες με τη χρήση διαφορετικών κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων έχουν δοκιμαστεί σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών προκειμένου να καθοριστούν οι συνθήκες κρυοσυντήρησης και αποθήκευσης [141]. Μεταξύ αυτών, η μέθοδος της υαλοποίησης μπορεί να χαρακτηριστεί η καλύτερη τρέχουσα μέθοδος κρυοσυντήρησης διότι συνδυάζει κρυοπροστατευτικούς παράγοντες με χαμηλό και υψηλό μοριακό βάρος. Ως αποτέλεσμα αυτού, η εξωκυττάριος θεμέλια ουσία θα μπορούσε να διατηρηθεί αποτελεσματικά, ενώ τα κύτταρα του ιστού ανακτώνται με υψηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους κρυοσυντήρησης.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθούν τρία διαφορετικά διαλύματα κρυοσυντήρησης, ένα εμπορικό κρυοπροστατευτικό διάλυμα ("CryostorTM"), ένα διάλυμα υαλοποίησης (VS55) και το διάλυμα HMC, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση του ιστού της βαρτονείου γέλης. Τα τρία αυτά κρυοπροστατευτικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την κρυοσυντήρηση ιστού βαρτονείου γέλης στους -196°C για χρονική περίοδο 7, 14 και 30 ημερών. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, ο ιστός της βαρτονείου γέλης αποψύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των MSCs. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε μη κρυοσυντηρημένος ιστός βαρτονείου γέλης ως αρνητικό δείγμα αναφοράς και ιστός κρυοσυντηρημένος χωρίς τη χρήση κρυοπροστατευτικών παραγόντων, ως θετικό δείγμα αναφοράς.

Ειδικότερα, τα MSCs που απομονώθηκαν και επεκτάθηκαν επιτυχώς από τον κρυοσυντηρημένο ιστό βαρτονείου γέλης, και των τριών πειραματικών συνθηκών και παρατηρήθηκε κάλυψη της καλλιεργητικής επιφάνειας κατά την 18^η ημέρα κυτταροκαλλιέργειας. Μορφολογικά τα MSCs από κρυοσυντηρημένο ιστό, είχαν σχήμα ατράκτου χωρίς παρατηρήσιμες διαφορές σε σύγκριση με τα MSCs που ελήφθησαν από το μη κρυοσυντηρημένο ιστό βαρτονείου γέλης (αρνητικό δείγμα αναφοράς). Από την άλλη πλευρά, δεν απομονώθηκαν κύτταρα από τον ιστό που αποθηκεύτηκε στους -196 °C χωρίς την χρήση κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων (θετικό δείγμα αναφοράς). Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη του Roy και των συναδέλφων του [142], όπου αντιμετώπισαν τις ίδιες δυσκολίες όσον αφορά την απομόνωση των βιώσιμων κυττάρων. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι η αποθήκευση του ιστού χωρίς την χρήση κρυοπροστατευτικών μέσω ευνοεί την ανάπτυξη του ενδογενούς σχηματισμού πάγου και βλάβη των κυττάρων που βρίσκονται στο ιστό. Αντίθετα, τα πρωτόκολλα υαλοποίησης, ενδεχομένως θα μπορούσαν να αποθηκεύσουν σωστά τον ιστό σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες συνδυάζοντας κρυοπροστατευτικά μέσα χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους. Σύμφωνα με τις κρυοβιολογικές αρχές, οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους μπορούν να διεισδύσουν αποτελεσματικά στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, συμβάλλοντας έτσι στην σωστή διατήρηση των κυττάρων. Οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες υψηλού μοριακού βάρους είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου, μειώνοντας τη θερμομηχανική καταπόνηση των ιστών και

προστατεύοντας περαιτέρω τα κύτταρα που κατοικούν στο ιστό από τυχόν βλάβες που προκαλούνται από τις χαμηλές θερμοκρασίες.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ανα ανακαλλιέργεια, της CDT, και της κυτταρικής βιωσιμότητας από MSCs που ελήφθησαν από τα υαλοποιημένα ιστό, προκειμένου να αξιολογηθεί πλήρως η επίδραση των διαλυμάτων κρυσυντήρησης στον ιστό. Τα MSCs που απομονώθηκαν από τον υαλοποιημένο ιστό επιτυγχάνουν με επιτυχία να φτάσουν μέχρι την 5^η ανακαλλιέργεια με μέσο αριθμό 2.8×10^7 κυττάρων για το διάλυμα CryostorTM, 2.9×10^7 κύτταρα για το VS55 και 2.5×10^7 κύτταρα για το HMC για την πρώτη εβδομάδα κρυσυντήρησης, για την δεύτερη εβδομάδα κρυσυντήρησης ο μέσος αριθμός κυττάρων έφτασε 2×10^7 για το διάλυμα CryostorTM, 2.7×10^7 κύτταρα για το VS55 και 2.3×10^7 κύτταρα για το HMC, ενώ για την τέταρτη εβδομάδα κρυσυντήρησης ο μέσος αριθμός κυττάρων έφτασε 2.3×10^7 για το διάλυμα CryostorTM, 2.1×10^7 κύτταρα για το VS55 και 2.5×10^7 κύτταρα για το HMC. Παράλληλα, ο μέσος αριθμός κυττάρων που ελήφθησαν από τον μη κρυσυντηρημένο ιστό έφτασε 3.3×10^7 κύτταρα. Με βάση τη δοκιμασία κυανού τρυπανίου (trypan blue), η μέση κυτταρική βιωσιμότητα των παραπάνω δειγμάτων ήταν $93,5 \pm 3,6\%$ για τα MSCs που προέρχονται από τον κρυσυντηρημένο ιστό CryostorTM και $95 \pm 2,2\%$ από ιστό κρυσυντηρημένο με VS55 και $93 \pm 3,2\%$ από ιστό κρυσυντηρημένο με HMC για την πρώτη εβδομάδα κρυσυντήρησης. Παρόμοια εικόνα έδειξαν οι επόμενες δύο εβδομάδες κρυσυντήρησης αφού η ζωτικότητα δεν έπεσε σε καμία κάτω από το 85%. Η ανάλυση ανοσοφαινότυπου αποκάλυψε ότι τα MSC ήταν περισσότερο από 80% θετικά για CD90, CD105, CD73, CD29, CD44 και λιγότερο από 2% αρνητικά για CD3, CD31, CD14, CD45 και HLA-DR. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντική διαφορά σε αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής σε σύγκριση με τα MSC's που ελήφθησαν από μη κρυσυντηρημένα δείγματα.

Περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων διαλυμάτων κρυσυντήρησης στα απομονωμένα MSCs όσον αφορά την δυναμικότητα τους, πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας διαφοροποίησής τους προς λιπογενές, οστεογενές και χονδρογενές κυτταρικές σειρές με τη χρήση καθορισμένων αυξητικών παραγόντων. Πράγματι, τα MSCs με επιτυχία ανέπτυξαν αποθέσεις ασβεστίου και κενοειδή λιπιδίων υπό συνθήκες οστεογενής και λιπογενής επαγωγής αντίστοιχα όπως ταυτοποιήθηκαν με τις χρώσεις Alizarin Red S και Oil Red O. Επιπλέον, υπό συνθήκες χονδρογενής επαγωγής, τα MSC's κατάφεραν να παράγουν

θεικές γλυκοζαμινογλυκάνες, βασικά μακρομόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του χόνδρου, υποδεικνύοντας την επιτυχή διαφοροποίηση προς την χονδρογενή σειρά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα κατέδειξαν σαφώς τη συγκράτηση των ιδιοτήτων μεσεγγυματικών στελεχιαίων κυττάρων σε κύτταρα που ελήφθησαν από υαλοποιημένους ιστούς. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες περιλαμβάνουν τη χρήση συμβατικών μεθόδων κρυοσυντήρησης για την αποθήκευση ιστού της Βαρτονείου Γέλης σε χαμηλές θερμοκρασίες με αντιφατικά αποτελέσματα. Παρά τη σημαντική αυτή διαφορά στην πειραματική διαδικασία, τα αποτελέσματά μας σχετικά με την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και τη διαφοροποίηση πολλαπλών γραμμών MSC φαίνεται να συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες [143]. Στη μελέτη του Shivakumar και των συναδέλφων του [144], η επιτυχής απομόνωση, επέκταση και πολλαπλή διαφοροποίηση MSCs ήταν αρκετά παρόμοια με τα αποτελέσματά μας με τη μόνη διαφορά ότι στη μελέτη μας το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης για την αποθήκευση του ιστού της βαρτονείου γέλης ήταν η υαλοποίηση. Επιπλέον, για την διερεύνηση της επίδραση της μεθόδου της υαλοποίησης στον ιστό, πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση με τις χρώσεις H & E και Sirius Red. Ο ιστός της Βαρτονείου γέλης είναι ένας πυκνός ζελατινώδης ιστός όπου περιέχει τα MSCs [145]. Όπως αποκαλύφθηκε με τη χρώση H & E, ο σχηματισμός αυτός του ιστού, διατηρήθηκε μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου υαλοποίησης και με τα τρία κρυοπροστατευτικά διαλύματα, χωρίς να παρουσιάζει σημαντικές μορφολογικές διαφορές από τον μη κρυοσυντηρημένο ιστό της βαρτονείου γέλης. Από την άλλη πλευρά, ο ιστός της βαρτονείου γέλης που είχε αποθηκευτεί στο υγρό άζωτο χωρίς την χρήση κρυοπροστατευτικών μέσων, εμφάνισε εκτεταμένη καταστροφή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με συνοδευόμενη βλάβη των κυττάρων που περιλαμβάνει ο ιστός. Αυτή η μορφολογία είναι αρκετά χαρακτηριστική όταν εμφανίζεται σχηματισμός εξωκυττάριου πάγου κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης.

Μετά τη λειτουργική αξιολόγηση των κυττάρων, ακολούθησε η αξιολόγηση της έκφρασης του HLA-G. Το HLA-G στην εγκυμοσύνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στην τροφοβλάστη και σε άλλους εξω-εμβρυικούς ιστούς, ώστε να επιτευχθεί ανοσοκαταστολή στη μητέρα έναντι του ημιαλλογενούς εμβρύου. Ως εκ τούτου, στον ιστό της βαρτονείου γέλης που είναι πλούσιος σε MSCs παρατηρείται έντονη έκφραση του HLA-G [136]. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας έδειξαν θετική έκφραση του HLA-G σε ιστό βαρτονείου γέλης προερχόμενο και από τις δύο πειραματικές συθήκες (μη

κρυοσυντηρημένος και υαλοποιημένος ιστός). Επιπρόσθετα, διεξήχθη έμμεσος ανοσοφθορισμός σε MSCs έναντι του HLA-G με τα αποτελέσματα να δείχνουν θετική έκφραση του HLA-G στα MSCs που απομονώθηκαν από μη κρυοσυντηρημένο ιστό και από υαλοποιημένο ιστό.

Για να εκτιμηθεί περαιτέρω η υπόθεση της έκφρασης του HLA-G από τις δύο πειραματικές μεθόδους πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση.

Τα MSCs που απομονώθηκαν από μη κρυοσυντηρημένο και από υαλοποιημένο ιστό, εκφράσανε επιτυχώς τις ισομορφές του HLA-G1, G5 και G7. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τη μελέτη των Ding *et al* όπου παρατήρησαν ίδια έκφραση του HLA-G σε MSCs απομονωμένα από βαρτόναιο γέλη. Η μεμβρανική ισομορφή HLA-G1 είναι υπεύθυνη για την αποτροπή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων [136]. Επιπρόσθετα, οι εκκρινόμενες ισομορφές HLA-G5 και HLA-G7 εμπλέκονται στην ανοσοανεκτικότητα και στην αποδοχή του αλλογενούς μοσχεύματος [136]. Η ικανότητα των MSCs να εκφράζουν μεμβρανικές και διαλυτές ισομορφές του HLA-G είναι καθοριστικής σημασίας, διότι καθιστά τα κύτταρα αυτά ικανά για τη χρήση σε ανάγκες ανοσορρύθμισης του οργανισμού. Επιπρόσθετα, η κυτταρομετρία ροής για το HLA-G έδειξε ότι και από τις δύο πειραματικές διαδικασίες το HLA-G εκφράστηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95%, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης.

Η ικανότητα των MSCs μπορούν να καταστέλλουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αξιολογήθηκε από τη Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση (*Mixed Lymphocyte Reaction* - MLR). Απομονωμένα MSCs από μη κρυοσυντηρημένο και από υαλοποιημένο ιστό, έδειξαν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες μειώνοντας τον αριθμό των κυττάρων όπου πραγματοποιήθηκε αλλοαναγνώριση. Αντίθετα, αυξημένος αριθμός των κυττάρων «απαντητών» παρατηρήθηκε στην αντίδραση που δεν προστέθηκαν MSCs. Η ιντεφερόνη-γ, η οποία παράγεται από τα πολυμορφοπύρρηνα, ευθύνεται για την ενεργοποίηση των MSCs. Ως απόκριση στα υψηλά επίπεδα της ιντεφερόνης-γ τα MSCs εκφράζουν την ICAM-1 και αρκετούς ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, όπως τον IDO, HLA-G, και την IL-10 με αποτέλεσμα την επιστράτευση των βοηθητικών T κυττάρων για μείωση της ανοσοαπόκρισης. Επιπρόσθετα, τα MSCs μπορούν αποτελεσματικά να ρυθμίσουν την ανοσιακή απόκριση ενεργοποιώντας τα T ρυθμιστικά κύτταρα [136]. Σε αντιστοιχία με τα

παραπάνω, η δοκιμασία της MLR έδειξε ότι τα MSCs ήταν ικανά να καταστείλουν την ανοσοαπόκριση, μειώνοντας τον αριθμό των PBMNS.

Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, η μέθοδος της υαλοποίησης μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική μέθοδο κρυοσυντήρησης οπού μπορεί να αποθηκεύσει τον ιστό της βαρτονείου γέλης χωρίς τα MSCs να χάσουν ιδιότητες τους. Κατά αυτόν τον τρόπο τα MSCs θα μπορούν να αποκτηθούν σε επιθυμητό χρόνο που υπάρχει ανάγκη από τον ασθενή και να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε εξατομικευμένες θεραπείες όπως ανοσορρύθμιση του οργανισμού ή εφαρμογες αναγεννητικής ιατρικής.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Smith A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060-1060
- [2] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282:1145–1147.
- [3] Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4):663–676.
- [4] Allen, T. and Cowling, G. (2011). *The Cell*, volume 285 of *A Very Short Introduction*. Oxford University Press.
- [5] Coopman, K. (2011). Large-Scale Compatible Methods for the Preservation of Human Embryonic Stem Cells: Current Perspectives. *Biotechnology Progress*, 27(6):1511–1521.
- [6] Hunt, C. J. and Timmons, P. M. (2007). Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cell Lines. In Day, J. G. and Stacey, G. N., editors, *Methods in Molecular Biology* vol. 368: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Second Edition, pages 261–270. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [7] Hyslop, L. A., Armstrong, L., Stojkovic, M., and Lako, M. (2005). Human embryonic stem cells: biology and clinical implications . *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(19):1–21.
- [8] Want, A. J., Nienow, A. W., Hewitt, C. J., and Coopman, K. (2012). Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask. *Regenerative Medicine*, 7(1):71–84.
- [9] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282:1145–1147.
- [10] Heijnen, E. M. E. W., Eijkemans, M. J. C., De Klerk, C., Polinder, S., Beckers, N. G. M., Klinkert, E. R., Broekmans, F. J., Passchier, J., Te Velde, E. R., Macklon, N. S., and Fauser, B. C. J. M. (2007). A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *The Lancet*, 369(9563):743–749.
- [11] Slack, J. (2012). *Stem Cells*, volume 303 of *A Very Short Introduction*. Oxford University Press.

- [12] Matsuo, A., Yamazaki, Y., Takase, C., Aoyagi, K., and Uchinuma, E. (2008). Osteogenic Potential of Cryopreserved Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured With Autologous Serum. *Journal of Craniofacial Surgery*, 19(3):693–700.
- [13] Mason, C. and Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, 3(1):1–5.
- [14] Goodell, M. A. (1999). CD34+ or CD34- Does it Really Matter? . *Blood*, 94(8):2646–2547.
- [15] Abbruzzese, L., Agostini, F., Durante, C., Tołola, R. T., Rupolo, M., Rossi, F. M., Lleshi, A., Zanolin, S., Michieli, M., and Mazzucato, M. (2013). Long term cryopreservation in 5+cells viability and allows satisfactory hematological engraftment after peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sanguinis*, 105(1):77–80.
- [16] Hunt, C. J., Armitage, S. E., and Pegg, D. E. (2003). Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology*, 46(1):76–87.
- [17] Cohnheim J (1867). Ueber entzündung und eiterung. *Virchows Archiv* 40: 1–79.
- [18] Prockop DJ (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71–74.
- [19] Friedenstein AJ, J Gorskaja and N Kulagina (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 4: 267–274.
- [20] Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9:641–650.
- [21] Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
- [22] Caplan AI and SP Bruder (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7: 259–264.
- [23] Brinchmann JE (2008). Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *Journal of the Neurological Sciences* 265: 127–130.
- [24] Wei G, G Schubiger, F Harder and AM Møller (2000). Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes? *Stem Cells* 18: 409–414.
- [25] Hattori H, M Sato, K Masuoka, M Ishihara, T Kikuchi, T Matsui, B Takase, T Ishizuka, M Kikuchi and K Fujikawa (2004). Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 178: 2–12.

- [26] Anderson DJ, FH Gage and IL Weissman (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nature Medicine* 7: 393–395.
- [27] Lagasse E, H Connors, M Al-Dhalimy, M Reitsma, M Dohse, L Osborne, X Wang, M Finegold, IL Weissman and M Grompe (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine* 6: 1229–1234.
- [28] Salem HK., Thiernemann C (2010). Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells*, 28(3):585-96. doi: 10.1002/stem.269.
- [29] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-7.
- [30] Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006;174:249-82.
- [31] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67-73.
- [32] Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, et al. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*, 5(4), 378-386.
- [33] Shockley KR, Rosen CJ, Churchill GA and Lecka-Czernik B. (2007). PPARgamma2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Res*, 2007, 81219. doi: 10.1155/2007/81219
- [34] Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C and Klingemann H. (2007). Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13(12), 1477-1486. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048
- [35] Phinney DG and DJ Prockop (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. *Stem Cells* 25: 2896–2902.
- [36] <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mscs+&Search=Search>
- [37] Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.*, 10(1):93-103. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.005
- [38] Troyer and Weiss. Wharton’s Jelly -derived cells are a primitive stromal cells population. *Stem Cells* 2008 Mar;26(3):591-9. Epub 2007 Dec 6.

- [39] Baksh D, Yao R, Tuan RS (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25(6):1384-92. doi : 10.1634/stemcells.2006-0709
- [40] Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2):319-31.
- [41] Minguell JJ, Conget P and Erices A. (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, 33(8), 881-887.
- [42] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5), 1878-1887. doi: 10.1182/blood-2005-06-2211
- [43] Shang Y, Zhang C, Wang S, Xiong F, Zhao C, Peng F, Feng S, Yu M, Li M, Zhang Y (2007). Activated b-catenin induces myogenesis and inhibits adipogenesis in BM-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 9(7):667-81.
- [44] Rangappa S, Fen C, Lee EH et al. (2003) Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocyte. *Ann Thorac Surg* 75: 775-779. [45] Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM (2008). Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology*, 134(3):833-48. doi: 10.1053/j.gastro.2007.12.024
- [46] MA Lian, 2005
- [47] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.*, 31(10):890-6.
- [48] Uccelli A, Pistoia V, Moretta L (2007). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.*, 28(5):219-26.
- [49] Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.*, 21(2):216-25. doi: 10.1038/cdd.2013.158
- [50] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6(11):1282–1286. [PubMed: 11062543]

- [51] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363(9419):1439–1441. [PubMed: 15121408]
- [52] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815–1822. [PubMed: 15494428]
- [53] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30(1):42–48. [PubMed: 11823036]
- [54] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101(9):3722–3729. [PubMed: 12506037]
- [55] English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009;156 (1):149–160.
- [56] Zanjani ED, Flake AW, Almeida-Porada G, Tran N, Papayannopoulou T. Homing of human cells
- [57] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103(12):4619–4621. [PubMed: 15001472]
- [58] Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002;196(4):447–457.
- [59] Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000;164(7):3596–3599. [PubMed: 10725715]
- [60] English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2007;110(2):91–100. [PubMed: 17507101]

- [61] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006;108
- [62] Naji A, Rouas-Freiss N, Durrbach A, Carosella E, Sensebe L, Deschaseaux F. Concise Review: Combining Human Leukocyte Antigen G and Mesenchymal Stem Cells for Immunosuppressant Biotherapy. *Stem Cells* 2013;31:2296–2303
- [63] Rizzo R. Immunosuppressive Properties of HLA-G Molecules Produced by Mesenchymal Stroma Cells. *Transplantation Technologies and Research* 2013, 3:2
- [64] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1439-1441. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7
- [65] Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R (2009). Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.*, 183(2):993-1004. doi: 10.4049/jimmunol.0900803
- [66] Tanaka Y (2015). Human mesenchymal stem cells as a tool for joint repair in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.*, 33(4 Suppl 92):S58-62
- [67] Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Mönckeberg G, Figueroa FE (2010). Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 19(3):317-22.
- [68] Otero-Viñas M, Falanga V (2016). Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5(4):149-163
- [69] Dragoo J L, Samimi B, Zhu M, Hame S L, Thomas B J, Lieberman J R, Hedrick M H and Benhaim P 2003 Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads *J. Bone Joint Surg. Br.* 85 740–7
- [70] Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, Eljaafari A (2004) Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology* 41: 469-476

- [71] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64: 278- 294
- [72] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennet PR, Bellantuono I, Fisk NM (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 98: 2396-2402
- [73] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plasticadherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3213-3218
- [74] Leibo, S. (2013). *Cryobiology*. *Cryobiology*, 67(3):398.
- [75] Hammond, J. and Walton, A. (1929). An Attempt to Cross Hare and Rabbit. *Journal of Genetics*, 20(3):401–404.
- [76] Walton, A. (1930). The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *Journal of Experimental Biology*, 7:201–219
- [77] Luyet, B. J. (1937). The Vitrification of Organic Colloids and of Protoplasm.
- [78] Parkes, A. S. (1945). Preserving Spermatozoa at Low Temperatures. *British Medical Journal*, 2(4415):212–213.
- [79] Gordon, I. (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI Publishing, Wallingford.
- [80] Clarke, G. N., Bourne, H., Hill, P., Johnston, W. I. H., Speirs, A., McBain, J. C., and Baker, H. W. G. (1997). Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Human Reproduction*, 12(4):722–726.
- [81] Lovelock, J. and Bishop, M. (1959). Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature*, 183(May 16 1959):1394–1395.
- [82] Parkes, A. S. (1957). Introductory Remarks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147(929):423–426.
- [83] Jones, N. C. H., Mollison, P. L., and Robinson, M. A. (1957). Factors Affecting the Viability of Erythrocytes Stored in the Frozen State. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147(929):476–497.
- [84] Mazur, P., Leibo, S., and Chu, E. H. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71(2):345–355.
- [85] Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., van Gent I, Rijkmans, C. M., and Drogendijk,

- A. C. (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 42(2):293–296.
- [86] Coopman, K. (2011). Large-Scale Compatible Methods for the Preservation of Human Embryonic Stem Cells: Current Perspectives. *Biotechnology Progress*, 27(6):1511–1521.
- [87] Davis, J. (2011). *Animal Cell Culture. Essential Methods*. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1 edition.
- [88] Karlsson, J. O. M. and Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation- critical issues. *Biomaterials*, 17:243–256.
- [89] Berz, D., McCormack, E. M., Winer, E. S., Colvin, G. A., and Quesenberry, P. J. (2007a). Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American Journal of Hematology*, 82(6):463–472.
- [90] Li, Y., Tan, J.-C., and Li, L.-S. (2008). Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*, 93(3):999–1005.
- [91] Heidemann, R., Lünse, S., Tran, D., and Zhang, C. (2010). Characterization of cell-banking parameters for the cryopreservation of mammalian cell lines in 100-mL cryobags. *Biotechnology Progress*, 26(4):1154–1163.
- [92] Kleeberger, C. A., Lyles, R. H., Margolick, J. B., Rinaldo, C. R., Phair, J. P., and Giorgi, J. V. (1999). Viability and Recovery of Peripheral Blood Mononuclear Cells Cryopreserved for up to 12 Years in a Multicenter Study. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1):14–19.
- [93] Hunt, C. J. (2011). Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2):107–123.
- [94] Fowler, A. and Toner, M. (2005). Cryo-Injury and Biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1):119–135.
- [95] Debendetti, P. G. and Stanley, H. E. (2003). Supercooled and Glassy Water. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 15(45):R1669.
- [96] Hochi, S., Akiyama, M., Minagawa, G., Kimura, K., and Hanada, A. (2001). Effects of Cooling and Warming Rates during Vitrification on Fertilization of in Vitro-Matured Bovine Oocytes. *Cryobiology*, 42(1):69–73.
- [97] He, X., Park, E. Y. H., Fowler, A., Yarmush, M. L., and Toner, M. (2008). Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*, 56(3):223–232.

- [98] Rowley, J., Abraham, E., Campbell, A., Brandwein, H., and Oh, S. (2012a). Meeting Lot-Size Challenges of Manufacturing Adherent Cells for Therapy. *BioProcess International*, 10(3):16–22.
- [99] Shaw, J., Oranratnachai, A., and Trounson, A. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1):59–72.
- [100] Coopman, K. (2011). Large-Scale Compatible Methods for the Preservation of Human Embryonic Stem Cells: Current Perspectives. *Biotechnology Progress*, 27(6):1511–1521.
- [101] Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the Essential Antifreezes to Protect Life in the Frozen State. *CryoLetters*, 25(6):375–388.
- [102] Ciocirlan, O. and Iulian, O. (2009). Density, viscosity and refractive index of the dimethyl sulfoxide + o-xylene system. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(3):317–329.
- [103] Zampolla, T., Spikings, E., Zhang, T., and Rawson, D. M. (2009). Effect of methanol and Me₂SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology*, 59(2):188–194.
- [104] Windrum, P., Morris, T. C. M., Drake, M. B., Niederwieser, D., and Ruutu, T. (2005). Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplantation*, 36(7):601–603.
- [105] Hubel, A. (1997). Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine Reviews*, 11(3):224–233.
- [106] Baudot, A., Alger, L., and Boutron, P. (2000). Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 40(2):151–158.
- [107] Mandumpal, J. B., Kreck, C. A., and Mancera, R. L. (2011). A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(9):3839.
- [108] Wernke, M. J. (2014). Glycerol. In Wexler, P., editor, *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition), pages 754–756. Academic Press, Oxford.
- [109] Allen, T. and Cowling, G. (2011). *The Cell*, volume 285 of *A Very Short Introduction*. Oxford University Press.
- [110] Tan, H. W., Aziz, A. R. A., and Aroua, M. K. (2013). Renewable and Sustainable Energy Reviews. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27(C):118–127.

- [111] Morris, G. J., Goodrich, M., Acton, E., and Fonseca, F. (2006). The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology*, 52(3):323–334.
- [112] Muldrew, K. and McGann, L. E. (1999). *Cryobiology - A Short Course*. Published Online, accessed 24 Jun 12, University of Calgary, Alberta, Canada.
- [113] Tanaka, Y., Ohta, K., Kubota, H., and Makita, T. (1988). Viscosity of aqueous solutions of 1,2-ethanediol and 1,2-propanediol under high pressures. *International Journal of Thermophysics*, 9(4):511–523.
- [114] Keros, V., Rosenlund, B., Hultenby, K., Aghajanova, L., Levkov, L., and Havatta, O. (2005). Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Human Reproduction*, 20(6):1676–1687.
- [115] Emiliani, S., Van den Bergh, M., Vannin, A.-S., Biramane, J., and Englert, Y. (2000). Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*, 15(4):905–910.
- [116] Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the Essential Antifreezes to Protect Life in the Frozen State. *CryoLetters*, 25(6):375–388.
- [117] Sharp, D. M. C., Picken, A., Morris, T. J., Hewitt, C. J., Coopman, K., and Slater, N. K. H. (2013). *Cryobiology*. *Cryobiology*, 67(3):305–311.
- [118] Rodrigues, J. P., Paraguass'u-Braga, F. H., Carvalho, L., Abdelhay, E., Bouzas, L. F., and Porto, L. C. (2008). Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*, 56(2):144–151.
- [119] Acker, J. P., Lu, X.-m., Young, V., Cheley, S., Bayley, H., Fowler, A., and Toner, M. (2003). Measurement of trehalose loading of mammalian cells porated with a metal-actuated switchable pore. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(5):525–532.
- [120] Benaroudj, N., Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (2001). Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26):24261–24267.
- [121] Fahy, G. M. (2010). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, 60(3 Suppl):S45–53.
- [122] Mazur, P. (1984). Freezing of living cells- mechanisms and implications. *American Journal of Cell Physiology*, 247(16):C124–C142.

- [123] Mazur, P., Seki, S., Pinn, I. L., Kleinhans, F. W., and Edashige, K. (2005). Extraand intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology*, 51(1):29–53.
- [124] Yu, Z.-W. and Quinn, P. J. (1994). Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Bioscience reports*, 14(6):259–281.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. (2003).
- [125] Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65(7):1035–1041.
- [126] Cox, M. A., Kastrup, J., and Hrubířsko, M. (2012). Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell and Tissue Banking*, 13(2):203–215.
- [127] Windrum, P., Morris, T. C. M., Drake, M. B., Niederwieser, D., and Ruutu, T.(2005). Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplantation*, 36(7):601–603.
- [128] Hunt, C. J., Armitage, S. E., and Pegg, D. E. (2003). Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology*, 46(1):76–87.
- [129] Technologies, L. Thawing frozen cells- life technologies. <http://www.lifetechnologies.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/thawing-cells.html>.
- [130] Hunt, C. J. and Timmons, P. M. (2007). Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cell Lines. In Day, J. G. and Stacey, G. N., editors, *Methods in Molecular Biology* vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition, pages 261–270. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [131] Smith, D. and Coopman, K. (2011b). Exploring the Effect of Thawing Rates after Cryopreservation . Technical Report 142, Centre for Biological Engineering, Loughborough University.
- [132] Schoene and Kamara *Free Radical Biology & Medicine* (01 Aug 1999, 27(3-4):364-369)
- [133] Qinjun Z, Hongying Ren, Zhongchao H. ‘Mesenchymal stem cells:Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases’. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2 (2016) 3-20
- [134] Gimenes F, Teixeira J J V, Pimenta de Abreu A L, Souza R P, Pereira M W, Sela da Silva V R, Bôer C G, Maria-Engle S S, Bonini M G, Borelli S D, Consolaro M E. ‘Human

leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: A candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker?' *Biochimica et Biophysica Acta* 1846 (2014) 576–589

[135] Jang T, Park S, Yang J, Kim J, Seok J, Park U, Choi C, Lee S, Han J. Cryopreservation and its clinical applications *Integrative Medicine Research* Volume 6, Issue 1, March 2017, Pages 12-18

[136] Ding, D.C.; Chou, H.L.; Chang, Y.H.; Hung, W.T.; Liu, H.W.; Chu, T.Y. Characterization of HLA-G and Related Immunosuppressive Effects in Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. *Cell Transplant.* 2016, 25, 217–228.

[137] Gregori, S.; Tomasoni, D.; Pacciani, V.; Scirpoli, M.; Battaglia, M.; Magnani, C.F.; Hauben, E.; Roncarolo, M.G. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010, 116, 935–944.

[138] Fong, C.Y.; Subramanian, A.; Biswas, A.; Bongso, A. Freezing of Fresh Wharton's Jelly from Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies. *J. Cell. Biochem.* 2016, 117, 815–827.

[139] Goto, T.; Murata, M.; Terakura, S.; Nishida, T.; Adachi, Y.; Ushijima, Y.; Shimada, K.; Ishikawa, Y.; Hayakawa, F.; Nishio, N.; et al. Phase I study of cord blood transplantation with intrabone marrow injection of mesenchymal stem cells: A clinical study protocol. *Medicine* 2018, 97, e0449.

[140] Wang, Q.; Yang, Q.; Wang, Z.; Tong, H.; Ma, L.; Zhang, Y.; Shan, F.; Meng, Y.; Yuan, Z. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum. Vaccin Immunother.* 2016, 12, 85–96.

[141] Wowk B (2010) Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology* 60: 11-22.

[142] Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP (2013) Optimum Parameters for Freeze-Drying Decellularized Arterial Scaffolds. *Tissue Eng. Part C Methods* 19: 981-990.

[142] Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M, (2014) A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology* 68: 467-472.

[143] Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, et al. (2011) Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24: 73-81.

[144] Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, Jang SJ, Park JS, et al. (2016) DMSO and

Serum-Free Cryopreservation of Wharton's Jelly Tissue Isolated from Human Umbilical Cord. *J Cell Biochem* 117: 2397-2412.

[145] Jadalannagari S, Converse G, McFall C, Buse E, Filla M, et al. (2017) Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLoS One* 12: e0172098.