

Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών





Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟ ΒΑΡΤΟΝΕΙΟΥ ΓΕΛΗΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΩΣ ΒΙΟΫΛΙΚΟ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

GRADUATE THESIS

Evaluation of decellularization process of Wharton's Jelly tissue, and its possible use as a biomaterial in regenerative medicine

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ΝΑΜΕ OF STUDENT Δημήτρης Αβράμπος Dimitris Avrampos

ONOMA ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR Ευστάθιος ΜιχαλόπουλοςEfstathios Michalopoulos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2020



Faculty of Health and Caring Professions Department of Biomedical Sciences





Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

Evaluation of decellularization process of Wharton's Jelly tissue, and its possible use as a biomaterial in regenerative medicine

NAME OF STUDENT: Dimitris Avrampos Registration Number: 62115119 avra25031997@gmail.com

> FIRST SUPERVISOR Efstathios Michalopoulos

> > AIGALEO 2020

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Δημήτρης Αβράμπος.

<u>Ευχαριστίες</u>

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς ορισμένα άτομα χάρις στην βοήθεια των οποίων πραγματοποιήθηκε η εν λόγο πτυχιακή και δίχως την καθοριστικής σημασίας βοήθειας και καθοδήγηση τους δεν θα εκπληρωνόταν το όλο εγχείρημα. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ευστάθιο Μιχαλόπουλο, ο οποίος εκτός από εισηγητής ανάθεσης της πτυχιακής ήταν και ο άνθρωπος που μεσολάβησε ώστε να γίνω αποδεκτός στο εργαστήριο της Ελ. Τ. ΟΠΑ καθώς και την Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου διευθύντρια της Ελ. Τ. ΟΠΑ που αποδέχθηκε την αίτηση μου. Επίσης, όλο το εργαστηριακό προσωπικό της Ελ. Τ. ΟΠΑ, το οποίο ήταν δίπλα μου και συνέβαλε στην καθοδήγηση και στην εκπαίδευση μου καθόλα την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο. Τους ευχαριστώ για την βοήθεια τους και την σπουδαία εμπειρία που αποκόμισα.

Ωστόσο, ιδιαίτερη αναφορά και ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ. Παναγιώτη Μαλλή, ο οποίος από την πρώτη στιγμή που πήγα στο εργαστήριο ήταν δίπλα μου, δίνοντας μου πολύτιμες οδηγίες και καθοδήγηση. Χάρις σε εκείνον εκπαιδεύτηκα κατάλληλα και καθοδηγήθηκα με απόλυτη σαφήνεια τόσο πρακτικά όσο και σε θεωρητικό υπόβαθρο για την εν λόγο πτυχιακή εργασία. Χωρίς εκείνον η περάτωση της εν λόγο εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τις θυσίες που έχουν κάνει ώστε να επιτύχω τα όνειρα και τις φιλοδοξίες μου καθώς και για την αμέριστη στήριξη τους καθόλα την διάρκεια των προσπαθειών μου.

vii

<u>Περίληψη</u>

Εισαγωγή: Ο ιστός βαρτονείου γέλης, προερχόμενη από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα πολύτιμος λόγω των ξεχωριστών ιδιοτήτων του, με αποτέλεσμα την χρήση του σε εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής, όπως η ανάπλαση και η επούλωση ιστών. Ο ιστός αυτός γίνεται εκμεταλλεύσιμος πολλές φορές στον παραπάνω κλάδο όταν αποκυτταροποιηθεί και χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για ανάπλαση ιστών.

Σκοπός: Κύριος στόχος είναι η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης της βαρτονείου γέλης με σκοπό την αξιοποίηση της ως βιοϋλικό, με την βοήθεια της ιστομηχανικής, στην αναγεννητική ιατρική.

Μέθοδος: Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είναι η εξής: απομόνωση της βαρτονείου γέλης από τον ανθρώπινο ομφάλιο λώρο και αξιολόγηση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών αυτής όπως μέτρηση μήκους, πλάτους και πάχους των πόρων. Ακολουθούν τρία στάδια αποκυτταροποίησης του ιστού χρησιμοποιώντας: 1) διάλυμα CHAPS, 2) διάλυμα SDS και 3) διάλυμα amem+40% FBS. Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αποκυτταροποίησης στον ιστό της βαρτονείου γέλης πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές χρώσεις αιματοξυλίνης-εωσίνης, τολοουιδίνης, alcian blue, Sirious red και ορσεϊνης, ενώ ταυτόχρονα ποσοτικοποιήθηκε το κολλαγόνο, οι πρωτεογλυκάνες και το γενετικό υλικό.

Αποτελέσματα: Ακολουθώντας τα παραπάνω προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: στα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του ιστού παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους των αποκυτταροποιημένων δειγμάτων σε σύγκριση με το αρχικό τους βάρος και του πάχους τους, μείωση του μήκους, του πλάτους και της ολικής επιφάνειας αυτών και αύξηση της διαμέτρου των πόρων στον ιστό. Επίσης, η αποκυτταροποίηση του ιστού με βάση την χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης κρίνεται επιτυχής ενώ επιτεύχθηκε παρατήρηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του ιστού μέσω των ιστολογικών χρώσεων. Τέλος, όσο αναφορά τα πειράματα της ποσοτικοποίησης παρατηρήθηκε μείωση DNA, ολικών πρωτεϊνών, γλυκοζαμινογλυκανών και κολλαγόνου.

ix

Συμπεράσματα: Από τα πειράματα που διενεργήθηκαν προκύπτουν αποτελέσματα, τα οποία βοηθούν στην αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης του ιστού, κάποια μάλιστα και στατιστικώς σημαντικά ενώ παρόμοια αναφέρονται και στην διεθνή βιβλιογραφία. Μάλιστα, τα εν λόγο αποτελέσματα αποτελούν ενδείξεις που υποστηρίζουν την άποψη πως η βαρτόνειος γέλη αποτελεί ελπιδοφόρα και πολλά υποσχόμενη, για το μέλλον, αξιοποιήσιμη πηγή ιστού ως ικρίωμα στην αναγεννητική ιατρική.

<u>Abstract</u>

Introduction: The Wharton's jelly tissue, derived from human umbilical cord, is characterized valuable because of its unique properties, resulting in its use in regenerative medicine applications, such as tissue regeneration and healing. This tissue often becomes. This tissue often becomes exploitable on this field decellularized and used as a scaffold for tissue regeneration.

<u>Purpose</u>: The main goal is to evaluate the decellularization process of the Wharton's jelly tissue in order to use it as biomaterial, based on the principles of tissue engineering, in regenerative medicine.

Method: The methodology includes: Wharton's jelly tissue isolation from the human umbilical cord and evaluation of tissue morphometric characteristics such as the measurement of length, width, thickness and pores. Three cycles of tissue decellularization using 1) CHAPS solution, 2) SDS solution and 3) a-mem + 40% FBS solution. To evaluate the decellularization process, we performed staining with hematoxylin-eosin, Toluidine, Sirious red, and Orcein in histological sections of decellularized and no-decellularized tissue, and we quantified the collagen, proteoglycans and the genetic material (DNA).

<u>Results</u>: Following the above process we noticed some results: as far as the morphometric characteristics of the tissue are concerned that there was an increase in the weight of decellularized samples compared to their original weight and thickness, a decrease in their length, width and total surface area and an increase in the diameter of the pores of tissue. Also, tissue decellularization based on hematoxylin-eosin staining is considered successful and meanwhile the observation of extracellular components of the tissue's basic substance was successful through histological staining. Finally, with regard to quantification experiments was observed a decrease in DNA, total proteins, glycosaminoglycans and collagen.

Discussion: The experiments gave results, which help in the evaluation of decellularization of the tissue and some of them are statistically significant and meanwhile similar are mentioned in the international literature. In fact, these results are indicative of the view that Wharton's Jelly tissue is a promising, for the future, usable tissue source as a scaffold in regenerative medicine.

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση περί λογοκλοπήςiv
Ευχαριστίεςνii
Περίληψηix
Abstractxi
Συντομογραφίες
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:</u>
Εισαγωγή1
κεφαλαίο 1
1.1) Βαρτόνειος γέλη4
1.1.1.) Βασική οργάνωση βαρτονείου γέλης5
1.2) Σύσταση βαρτονείου γέλης7
1.3) ΠΗΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΡΤΟΝΕΙΟΥ ΓΕΛΗΣ14
1.4) Κυτταρικοί πληθυσμοί Βαρτονείου γέλης
КЕФАЛАЮ 2
2.1) Αναγεννητική ιατρική
2.2) ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ
2.3) Αποκυτταροποίηση
2.4) Ανοσιακή απόκριση έναντι αποκυτταροποιημένων δομών
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
3.1) Εφαρμογές βαρτονείου γέλης 48
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:
ΣΚΟΠΟΣ
κεφαλαίο 1
1.1) Γενικά διαλύματα2
1.1.1) Διάλυμα PBS 1x2
1.1.2) a-MEM(GIBCO)3
1.1.3) Penicillin-streptomycin (GIBCO)3
1.1.4) Διάλυμα FBS (GIBCO)4
1.2) Παρασκευή διαλυμάτων αποκυτταροποίησης4
1.2.1) Διάλυμα CHAPS4

1.2.2) Διάλυμα SDS	6
1.2.3) Διάλυμα a-MEM με FBS 40% v/v	7
1.2.4) Λοιπά διαλύματα	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	8
2.1) Ιστολογικός έλεγχος δειγμάτων	8
2.1.1) Μονιμοποίηση δειγμάτων	8
2.1.2) Αυτοματοποιημένη ιστολογική τεχνική	9
2.1.3) Μικροτόμιση δειγμάτων	10
2.1.4) Προετοιμασία τομών για χρώσεις	10
2.2) Μικροσκόπηση και επεξεργασία εικόνων	11
2.2.1) Μικροσκόπηση δειγμάτων	11
2.2.2) Επεξεργασία εικόνων	12
2.3) Στατιστική ανάλυση	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	12
3.1) Απομόνωση Βαρτονείου γέλης	12
3.2) Αποκυτταροποίηση Βαρτονείου γέλης	14
3.3) Μορφομετρικά χαρακτηριστικά Βαρτονείου γέλης	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	18
4.1) ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ-ΧΡΩΣΕΙΣ	19
4.1.2) Αιματοξυλίνη-Εωσίνη	22
4.1.3) Toluidine Blue	22
4.1.3) Alcian Blue	24
4.1.4) Sirious Red	25
4.1.5) Orcein	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	27
5.1) Ποσοτικοποίηση DNA και δομικών στοιχείων Βαρτονείου γέλης	27
5.1.1) Ποσοτικοποίηση DNA και ολικών πρωτεϊνών	28
5.1.2) Ποσοτικοποίηση ολικής ποσότητας κολλαγόνου	29
5.1.3) Ποσοτικοποίηση πρωτεογλυκανών	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα	38
6.1) Ιστολογικές τομές που πραγματοποιήθηκε η μελέτη	38
6.2) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης με βάση τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά	39
6.3) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων	45

6.4) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω της ποσοτικο DNA	»ποίησης του 62
6.5) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω της ποσοτικο δομικών συστατικών του ιστού βαρτονείου γέλης	»ποίησης των 63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

Συντομογραφίες

<u>Ελληνική ορολογία</u>	<u>Αγγλική ορολογία</u>	Συντομογραφία
Φυσικός ιστός με τα χαρακτηριστικά του δίχως κάποια επεξεργασία	Native	
Αποκυτταροποιημένος ιστός	Decellularization	Decel
Σε ζωντανό οργανισμό	in vivo	
Σε συνθήκες εργαστηρίου	in vitro	
Εξωκυτταρική θεμέλια ουσία	Extracellular matrix	ΕСΜ (αγγλική συντομογραφία). ΕΚΟ (ελληνική συντομογραφία).
Καινούργιο από την αρχή	De novo	
Κατηγορίες λεμφοκυττάρων	T lymphocytes 1 T lymphocytes 2	Th1 Th2
Επιφανειοδραστικός δείκτης	Cluster of differentiation	CD
Ιντερφερόνη β	Interferon b	IFN-B
Ιντερφερόνη γ	Interferon γ	IFN-γ
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας	Vascular endothelial growth factor	VEGF
Βασικός ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης-2	Basic fibroblast growth factor-2	FGF-2
Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β1	Transforming growth factor beta 1	TGF-b1
Ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-2 κ.ο.κ	Interleukin-1 Interleukin-2	IL-1,IL-2 к.о.к
Ηπατοκυτταρικός παράγοντας ανάπτυξης	Hepatocyte growth	HGF
Μονοκυτταρικός χημειοτρακτικός παράγοντας πρωτείνης-1.	Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1
Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας.	Brain-derived neurotrophic factor	BDNF
Φλεγμονώδης πρωτεΐνη μακροφάγων.	Macrophage inflammatory protein 1	MIP-1
Κυτοκίνη ρύθμισης της έκφρασης των Τ κυττάρων.	Regulated on activation, normal T- cell expressed, and secreted	RANTES
Προσταγλανδίνη Ε2.	Prostaglandin E2	PGE2

Αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια.	Platelet-derived growth factor	PDGF
Αυξητικός παράγοντας ΑΒ που προέρχεται από τα αιμοπετάλια.	Platelet-derived growth factor-AB	PDGF-AB
Αυξητικός παράγοντας RB που προέρχεται από τα αιμοπετάλια.	Platelet-derived growth factor-RB	PDGF-RB
Νευρογλοιακό αντιγόνο 2.	Neuron-glial antigen 2	NG2
Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας κατηγορίας 1.	Human leukocyte antigen-ABC	HLA-ABC
Κατηγορία αντιγόνων μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας της κατηγορίας 2.	Human leukocyte antigen-DR	HLA-DR
Αντιγόνο λευκοκυττάρων G6.	Human leukocyte antigen-G6	HLA-G6
2,3-διοξυγενάση ινδολαμίνης.	indoleamine 2,3- dioxygenase	IDO
Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας.	Epidermal growth factor	EGF
Βασικός ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης b.	Basic fibroblast growth factor-b	bFGF
Κυτοκίνη μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1.	Intercellular adhesion molecule-1	ICAM-1
Παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων.	Granulocyte colony- stimulating factor	G-CSF
Αυξητική ορμόνη.	Growth hormone	GH
Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1.	Insulin-like growth factor 1	IGF-1
Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων.	Macrophage colony- stimulating factor	MCSF
Πρωτεΐνη διέγερσης μακροφάγων 1-άλφα.	Macrophage inflammatory protein	MIP-1a

<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>

<u>Εισαγωγή</u>

Ο τομέας της αναγεννητικής ιατρικής και της ιστομηχανικής, τα τελευταία χρόνια έχουν διαγράψει ορισμένα θεαματικά επιτεύγματα στην ανάπλαση ιστών μέσω κατασκευής ικριωμάτων από αποκυτταροποιημένες δομές. Τα πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα προκλινικών και κλινικών μελετών δείχνουν πως τα ικριώματα θα αποτελέσουν στο μέλλον βασικό <<όπλο>> για την ανάπλαση και επούλωση ιστών ενώ η κατασκευή μηχανικών μοσχευμάτων μπορεί να φτάσει έως και την κατασκευή ολόκληρων οργάνων. Η επίτευξη αυτών θα φέρει επανάσταση στον χώρο της επιστήμης ενώ θα δοθούν πολύτιμες λύσεις στις μεταμοσχεύσεις, λόγω της τρομερής έλλειψης σε δότες οργάνων, στην ανάπλαση τραυματισμένων και κατεστραμμένων ιστών αλλά και σε ασθένειες όπως διαβήτης, νόσος Πάρκινσον και άλλες ανίατες νόσους που ταλανίζουν την ανθρωπότητα.

Ενδιαφέρουσα κρίνεται η αναφορά και σε κάποια βασικά ιστορικά στοιχεία που καταδεικνύουν την προαναφέρουσα πρόοδο του εν λόγο τομέα. Η ανάπτυξη της ιστομηχανικής έχει ξεκινήσει εδώ και χιλιάδες χρόνια κάτι που αποτελεί και έναν από τους λόγους επίτευξης σπουδαίων αποτελεσμάτων στις μέρες μας. Επικρατεί λοιπόν λανθασμένα η ψευδαίσθηση πως αποτελεί έναν νέο κλάδο αλλά η πραγματικότητα είναι πως οι έρευνες της χρονολογούνται ήδη από τον 16° αιώνα. Το 1988 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο όρος ιστομηχανική από το εργαστήριο του εθνικού ιδρύματος επιστημών. Μάλιστα, ο εν λόγο κλάδος γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη κατά την διάρκεια του Β παγκοσμίου πολέμου, λόγω της μεγάλης ανάγκης για αναδόμηση μερών του σώματος. Σε αυτή την κατεύθυνση συνέβαλε η ανακάλυψη και η διαθεσιμότητα νέων συνθετικών υλικών και ειδικότερα υλικών που προέρχονται από τον άνθρωπο (π.χ. βαρτόνειος γέλη) για την αποκατάσταση βλαβών στους ιστούς.

Όσο αναφορά την βαρτόνειο γέλη που είναι και το αντικείμενο μελέτης, η ύπαρξη της περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Thomas Wharton το 1656. Ωστόσο, ο τελευταίος δεν γνώριζε τίποτα για τα κύτταρα που υπήρχαν στον ιστό καθώς αυτά περιεγράφηκαν για πρώτη φορά εννέα χρόνια αργότερα από τον Hooke 1665.

Στα πλαίσια αυτά διεξήχθη και η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία, η οποία διεξάγεται σε ένα κομμάτι από την πολύπλοκη και εκτενή

διαδικασία κατασκευής ικριωμάτων. Συγκεκριμένα, ο σκοπός εκπόνησης της εν λόγο μελέτης είναι η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης σε ιστό βαρτονείου γέλης, ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο το οποίο αναλύεται διεξοδικώς παρακάτω, με στόχο την χρήση της ως βιοϋλικό στην αναγεννητική ιατρική. Ακολουθήθηκε, συγκεκριμένη διαδικασία απομόνωσης του εν λόγο ιστού από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, με την βοήθεια αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων, και αποκυτταροποιήθηκε με διενέργεια τριών κύκλων αποκυτταροποίησης. Για την εκπλήρωση του σκοπού της μελέτης και την με εξαγωγή συμπερασμάτων γνώμονα тην αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης, πραγματοποιήθηκε ιστολογικός έλεγχος με την διενέργεια μιας σειράς χρώσεων σε αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού αλλά και σε μη αποκυτταροποιημένα ώστε να υπάρχει αντικείμενο σύγκρισης. Επιπλέον, βασικά και διαφωτιστικά στην εκπλήρωση του σκοπού ήταν τα πειράματα ποσοτικοποίησης του γενετικού υλικού και των δομικών συστατικών του ιστού.

Τα ικριώματα, όπως αυτά που προέρχονται από αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο γέλη, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και πιθανολογείται από την επιστημονική κοινότητα πως θα αποτελέσουν επαναστατική μέθοδο σε τεχνικές επούλωσης ή ακόμη και σύνθεσης νέων ιστών και οργάνων. Ο κύριος στόχος λοιπόν της ύπαρξης τους είναι να επιταχύνουν και να υποβοηθήσουν τον ανθρώπινο οργανισμό στην ανάπλαση τραυματισμένων ή κατεστραμμένων ιστών (λόγω ασθενειών) που σε φυσιολογικές συνθήκες αυτό δεν θα ήταν δυνατό ή θα έπαιρνε πολύ περισσότερο χρόνο. Ειδικότερα, μέσω της τοποθέτησης αυτών ως εμφυτεύματα δρούν ως <<μαγνήτες>> χημειοτακτικών και αυξητικών παραγόντων, εκτός από εκείνους που ενδεχομένως διαθέτουν φυσικά, αλλά και κυττάρων επάγοντας τις διαδικασίες επούλωσης και σύνθεσης στην τραυματισμένη περιοχή. Μεγάλη πρόοδο έχει επιτευχθεί σε επίπεδο προκλινικών και κλινικών μελετών σε ικριώματα ανάπλασης χόνδρινου ιστού, αγγείων αλλά και στην χρήση αυτών ως επιφάνειες πάνω στις οποίες λαμβάνει χώρα η αρχή της επούλωσης ή της σύνθεσης του ιστού. Μάλιστα, οι ενδείξεις είναι αρκετά ενθαρρυντικές πως με την αλληλένδετη συνεργασία των ιστομηχανικών τεχνικών και της αναγεννητικής ιατρικής στο μέλλον θα επιτευχθεί η σύνθεση ιστών και ολόκληρων οργάνων κάτι που θα αποτελέσει σωτήρια εξέλιξη για ανθρώπους, οι οποίοι χάνουν την ζωή τους διότι δεν βρίσκουν τα κατάλληλα μοσχεύματα. Επιπροσθέτως, κρίνεται σκόπιμη η

αναφορά πως η βαρτόνειος γέλη ερευνάται για την χρήση της σε κυτταρικές και γονιδιακές θεραπείες, κυρίως μέσω της χρήσης των σπάνιων ιδιοτήτων των μεσεγχυματικών κυττάρων που διαθέτει. Τα πρώτα προκλινικά και κλινικά αποτελέσματα αφήνουν προσδοκίες για την επίλυση σπουδαίων ζητημάτων, όπως την θεραπεία κάποιων ειδών καρκίνου και ειδικότερα του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1) <u>Βαρτόνειος γέλη</u>

Ο ιστός βαρτόνειος γέλη είναι ένας αρχέγονος βλεννογόνος συνδετικός ιστός του ομφαλίου λώρου που υπάρχει μεταξύ αμνιακού επιθηλίου και των ομφαλικών αγγείων. Ειδικότερα, περικλείει τα τρία ομφάλια αγγεία, μία φλέβα και 2 αρτηρίες και περιβάλλεται από ένα στρώμα αμνιοτικών επιθηλιακών κυττάρων. Εμπλέκεται ως ένας ενεργά μεταβολικός ιστός στην ανταλλαγή υγρών μεταξύ των ομφαλικών αγγείων και του αμνιακού υγρού. Αναφέρεται ως ο συνδετικός ιστός αυτού και χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ πλέον γίνεται εκτεταμένη χρήση της βαρτονείου και σε κλινικές δοκιμές. Ειδικότερα, αποτελεί μορφή βλεννώδους συνδετικού ιστού που παρέχει αγγειακή και συσταλτική υποστήριξη στον ομφάλιο λώρο. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές την θεωρούν ως απλό συνδετικό ιστό σε σύγκριση με τους υγρούς ή σκελετικούς συνδετικούς ιστούς αλλά συνηθέστερα ταξινομείται ως βλεννώδης συνδετικός ιστός. Η αύξηση του όγκου της βαρτονείου γέλης είναι ανάλογη της ανάπτυξης του μήκους και της περιφέρειας του ομφάλιου λώρου. Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες της είναι η παρεμπόδιση της συστροφής των ομφαλικών αγγείων κατά την κίνηση του εμβρύου στην μήτρα, παρόλο που ο ίδιος ο Wharton πίστευε πως χρησίμευε ως υποκατάστατο σύστημα μεταφοράς λεμφαδένων. Μάλιστα, η έλλειψη βαρτονείου στον ομφάλιο αυξάνει τον κίνδυνο συμπίεσης στις πρόωρες εγκυμοσύνες (Davies, Walker, and Keating 2017). Η γέλη αυτή δεν περιέχει άλλα αγγεία αίματος ή λεμφαδένες και δεν διαθέτει νευρικό ιστό. Οι σχισμές της περιέχουν θεμέλια ουσία και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες του ιστού ενώ παρέχουν ένα χρήσιμο ορόσημο για την μελέτη του καθώς απουσιάζουν από την περιαγγειακή και υποαμνιοτική ζώνη και βάφονται καλά, λόγω της θεμέλιας ουσίας, με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Έτσι, αναφέρονται ως σημεία σύγκρισης και διαχωρισμού στις επιστημονικές έρευνες (Sobolewski et al. 1997). Επίσης, έχει χαρακτηριστεί από πολλούς ερευνητές ως διάκριτη πηγή μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη. Τα κύτταρα αυτά που προέρχονται από διάφορες περιοχές του ομφαλίου, τα οποία είναι <<αγκιστρωμένα>> στην θεμέλια ουσία της βαρτονείου, είναι πολύτιμες πηγές για την χρήση τους σε κυτταρικές θεραπείες.

Αυτά δεν εκφράζουν μόνο τους δείκτες που χαρακτηρίζουν τα μεσεγχυματικά της βαρτονείου και των περιαγγειακών κυττάρων αλλά πιθανότατα να αποτελούν την κύρια πηγή προγονικών κυττάρων που <<κατοικούν>> στην βαρτόνειο γέλη. Ιδιαίτερα αυξημένο ενδιαφέρον αποτελεί η πρόσφατη ανακάλυψη για την ύπαρξη ενός νέου υποπληθυσμού κυττάρων εντός αυτής τα λεγόμενα περιγεννητικά βλαστοκύτταρα (Taghizadeh, Cetrulo, and Cetrulo 2011). Από τις πηγές περιγεννητικών βλαστοκυττάρων εξέχουσα θέση κατέχει ο εν λόγο ιστός, ο οποίος φαίνεται να συγκεντρώνει τις μεγαλύτερες πιθανότητες και δυνατότητες για την χρήση των εν λόγο κυττάρων από αυτόν και την θεραπεία μιας ποικιλίας ασθενειών (Vieira Paladino et al. 2019).



Wharton's Jelly is the connective tissue surrounding the umbilical vessels and includes the perivascular, intervascular, and subamnion regions (zones 3-5)

Εικόνα 1: Ιστολογική τομή από ομφάλιο λώρο στην οποία απεικονίζονται τα βασικά ανατομικά μέρη του ομφαλίου αλλά και οι περιοχές που βρίσκεται η βαρτόνειος γέλη και συνεπώς τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα αυτής (πηγή: Troyer and Weiss 2008).

Σε κάποιες μελέτες μόνο ο ενδοαγγειακός ιστός χαρακτηρίζεται βαρτόνειος γέλη χωρίς όμως αυτό να έχει διευκρινιστεί από τον Thomas Wharton και από την υπόλοιπη διεθνή βιβλιογραφία. Γενικότερα, υπάρχει διαφορετική προσέγγιση από πολλούς ερευνητές όσο αναφορά τα ανατομικά όρια της διότι τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει ασχοληθεί διεξοδικά με τον εν λόγο ιστό. Ο καθορισμός των δομικών περιγραφών της είναι σημαντικός και αναγκαίος ώστε η μελέτη της να μην εμφανίζει σύγχυση στις πληροφορίες που παρέχονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πως αν δεν διασαφηνιστούν ακριβώς τα ανατομικά όρια και δεν γίνουν αποδεκτά από όλους είναι εύκολο να δημιουργηθεί σύγχυση από ποιο σημείο του ομφαλίου ο κάθε ερευνητής απομονώνει κύτταρα και κάνει την κλινική μελέτη (από όλη την βαρτόνειο γέλη, από την περιαγγειακή ζώνη ή την ενδοαγγειακή περιοχή της γέλης). Μάλιστα, η αποσαφήνιση αυτού του ζητήματος μπορεί να αποβεί καθοριστική σε διάφορες εφαρμογές της για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Η βασική περιγραφή με κριτήριο την οργάνωσης της αναφέρει πως χωρίζεται σε τρείς διακριτές περιοχές το υποαμνίον, την ενδιάμεση βαρτόνειο γέλη και την περιαγγειακή βαρτόνειο γέλη. Το αμνίον και το υποαμνίον της αποτελούν το όριο του ιστού με την στιβάδα του ομφαλίου. Η περιοχή ανάμεσα στην περιαγγειακή, στην οποία η βαρτόνειο γέλη περιβάλλει κάθε αγγείο ονομάζεται ενδιάμεση βαρτόνειο γέλη. Ωστόσο, ρεαλιστικά μόνο η επένδυση του ομφαλίου λώρου και η περιελισσόμενη βαρτόνειο γέλη μπορούν πρακτικά να διαχωριστούν από τις υπόλοιπες περιοχές ή ζώνες (Davies et al. 2017).



Εικόνα 2 : Ιστολογική τομή ομφάλιου λώρου στην οποία αναπαρίστανται τα βασικά ανατομικά του όρια καθώς και η θέση της βαρτονείου γέλης σε αυτόν (πηγή: Davies et al. 2017).

Στο περιφερικό κομμάτι του ομφαλίου η βαρτόνειος είναι καλυμμένη με στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο με εστιακή κεράτωση (Sobolewski et al. 1997). Άλλη περιγραφή της βασικής οργάνωσης αυτής με βάση την ιστολογική εμφάνιση αναφέρει πως χωρίζεται σε τρεις βασικές ζώνες: α)ένα υποσύνολο αραιού πληθυσμού κυττάρων που μοιάζουν με ινοβλάστες, (β) στην ενδοαγγειακή περιοχή, μια μήτρα συνδετικού ιστού που παρασκευάζεται κυρίως από κολλαγόνο Ι, στο οποίο συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των μεσεγχυματικών κυττάρων της βαρτονείου, (γ) στην περιαγγειακή περιοχή που περιβάλλει τα ομφάλια αγγεία (Vieira Paladino et al. 2019).

1.2) Σύσταση βαρτονείου γέλης

Η βαρτόνειος γέλη αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και άφθονη θεμέλια ουσία. Το κολλαγόνο Ι είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη ενώ στην γέλη περιλαμβάνονται ακόμη χονδροϊτίνες και πρωτεογλυκάνες θειικής δερματάνης με κυρίαρχη την ντεκορίνη πάνω από την διγλυκάνη. Επίσης, περιέχει υαλουρονίνη. θειωμένη γλυκοζαμινογλυκάνη και διαλυτές πρωτεΐνες πλάσματος. Το κυτταρικό περιεχόμενο του ιστού, δηλαδή τα κυτταρικά συστατικά του, απαρτίζεται από διάφορα είδη κυττάρων-υποκυτταρικών πληθυσμών με σημαντικότερα τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τους μυοϊνοβλάστες. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες συνεισφέρουν στην ελαστικότητα του ιστού συνθέτοντας τις κολλαγόνες ίνες και ρυθμίζοντας την ροή του ομφαλικού αίματος. Βέβαια η ποσότητα των κυττάρων δεν είναι πάρα πολύ μεγάλη και βρίσκονται κυρίως στο υποεπιθηλιακό στρώμα της βαρτονείου (Sobolewski et al. 1997). Στις μόνες περιπτώσεις που μπορεί να προκληθούν αλλαγές στην σύσταση της βαρτονείου γέλης είναι στην ύπαρξη διάφορων νοσημάτων κατά την εγκυμοσύνη όπως υπερτασικές εγκυμοσύνες, προεκλαμψία κ.α. (Davies et al. 2017).



Ωστόσο, το κολλαγόνο είναι το βασικό μέρος της εξωκυττάριας μήτρας της βαρτονείου που καταλαμβάνει πάνω από το 50% του απολιπωμένου ξηρού βάρους του ιστού ενώ εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα και δυσκολία στην διαλυτοποίηση του. Οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών που περιβάλλουν τις ίνες κολλαγόνου ίσως επηρεάζουν την διαλυτότητα της εν λόγο πρωτεΐνης. Μάλιστα, αναφέρεται πως οι αρνητικά φορτισμένες θειωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες αναπτύσσουν ισχυρούς ιονικούς δεσμούς με θετικά φορτισμένα αμινοξέα στην επιφάνεια των ινών κολλαγόνου. Τέτοια συμπλέγματα ίσως κάνουν το κολλαγόνο λιγότερο διαλυτό και την γέλη περισσότερο συμπαγή. Επιπλέον, πιθανολογείται πώς η υψηλή ποσότητα κολλαγόνου τύπου ΙΙΙ ευθύνεται κατά ένα βαθμό για την μη διαλυτοποίηση καθώς αυτός ο τύπος είναι γνωστό πως είναι λιγότερο διαλυτός από το κολλαγόνο τύπου Ι. Εκτός βέβαια από την κυρίαρχη μορφή του κολλαγόνου τύπου Ι η φασματοσκοπία μάζας αποκαλύπτει την παρουσία κολλαγόνου τύπων ΙΙ, ΙΙΙ, V, VI και XΙΙ, ινωδονεκτίνης-Ι και πρωτεΐνης lumican I (Davies et al. 2017; Sobolewski et al. 1997).

Αναλυτικότερα, ο ιστός χαρακτηρίζεται από την παρουσία χαλαρά διατεταγμένων ινών κολλαγόνου προς διάφορες κατευθύνσεις οι οποίες γίνονται αντιληπτές με την κατάλληλη χρώση.



Η ποσότητα τους αυξάνεται σε περιοχές που γειτνιάζουν με μεγάλα ομφαλικά αγγεία και ο προσανατολισμός τους χαρακτηρίζεται κυκλικός γύρω από αυτά. Οι ίνες παρουσιάζουν αργυροφιλικές ιδιότητες και διασταυρώσεις και βυθίζονται μέσα σε μια άμορφη ουσία που ταυτοποιήθηκε ως γλυκοζαμινογλυκάνη ενώ το ίδιο συμβαίνει στην υποεπιθηλιακή περιοχή αλλά και σε αυτές με τα μεγάλα ομφαλικά αγγεία. Επίσης αναφέρεται πως οι ίνες αυτές συνοδεύονται από ωσμωφιλικά μικροϊνίδια και ένα κοκκιώδες υλικό. (Sobolewski et al. 1997; Taghizadeh et al. 2011).

Στο υποεπιθηλιακό στρώμα η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών είναι εντονότερη. Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί το κυρίαρχο μέρος αυτών καθώς αποτελεί περισσότερο από το 70% της ολικής συγκέντρωσης τους ενώ έχει την τάση να σχηματίζει υδρογέλες και να συνεισφέρει σημαντικά στις ελαστικές ιδιότητες της βαρτονείου.



Επίσης, καθιστά τον ιστό έντονα ενυδατωμένο και ιξώδες. Οι ποσότητες των θειομένων γλυκοζαμινογλυκανών θειική κερατάνη, θειική-4-χονδροϊτίνη, θειική-6-χονδροϊτίνη, δερματάνη και ηπαρίνη είναι πολύ χαμηλότερες. Καθεμία από αυτές αποτελεί ένα μικρό ποσοστό των ολικών γλυκοζαμινογλυκανών. Από μελέτες αναφέρεται πως όλες τους είναι ακινητοποιημένες μέσα στο αδιάλυτο ινώδες δίκτυο του κολλαγόνου και κάποιες από αυτές παράγονται από μαστοκύτταρα που παρατηρούνται στον εν λόγο ιστό (Basiri et al. 2019; Gupta et al. 2020; Sobolewski et al. 1997; Taghizadeh et al. 2011).



Όσο αναφορά τις πρωτεογλυκάνες του ιστού είναι σημαντικό να τονιστεί πως δεν υπάρχουν πάρα πολλά επιστημονικά δεδομένα. Παρόλο αυτά από μελέτες αναφέρεται πως η παρουσία τους αντικατοπτρίζεται σε 2,43 +/-0,63 mg ανά γραμμάριο ιστού. Αποτελούν μακρομόρια κατασκευασμένα από πυρήνες πρωτεΐνης σπονδυλικής στήλης ομοιοπολικώς συνδεδεμένα με θειωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες. Πολλές διαφορετικές και γενετικά διακριτές βασικές πρωτεΐνες συνδυάζονται και δημιουργούνται τα εν λόγο μακρομόρια τα οποία εκφράζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Διακρίνονται διάφορου μεγέθους κλάσματα πρωτεογλυκανών από 45 kD έως και 260 kD. Οι λειτουργίες αυτών είναι πολυάριθμες και συγκεκριμένα: επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες του ιστού, ρυθμίζουν την οργάνωση της μήτρας κολλαγόνου, συμμετέχουν στην δημιουργία αντιθρομβογόνου φράγματος στον αγγειακό αυλό, συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις κυττάρων με άλλα κύτταρα ή διάφορα μόρια της εξωκυτταρικής μήτρας, δεσμεύουν αυξητικούς παράγοντες και ιούς κ.α. (Gogiel, Bańkowski, and Jaworski 2003).

Επίσης, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την έκφραση αρκετών ανοσορρυθμιστικών κυτοκινών, όπως η RANTES, υποδοχέας ιντερλευκίνης 6, ιντερλευκίνη 16, ιντερφερόνη γάμμα και πολλές ακόμη. Μάλιστα, παρατηρείται η έκφραση προφλεγμονώδων κυτοκινών, όπως ο παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων (MCSF), η πρωτεΐνη διέγερσης μακροφάγων 1-άλφα (MIP-1a) αλλά και αντιφλεγμονώδων, όπως του ανταγωνιστή υποδοχέα ιντερλευκίνης 1 κ.α. Επιπλέον, εκφράζονται και ομοιοστατικές κυτοκίνες, όπως αναστολέας ιστών μεταλλοπρωτεϊνάσης 1 και 2 και κυτοκίνες που σχετίζονται με την επούλωση πληγών συμπεριλαμβανομένων του μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1), του παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων (G-CSF), αλλά και ουσιών με ιδιότητες αναγέννησης όπως η αυξητική ορμόνη (GH) (Gupta et al. 2020).

Επιπροσθέτως, ο ιστός της βαρτονείου γέλης περιέχει πληθώρα παραγόντων ανάπτυξης που την καθιστούν σπάνιο βιοϋλικό, διότι εξαιτίας αυτών παρέχει ένα μοναδικό βιοχημικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, αποτελεί πλούσια πηγή κυτοκινών και πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων όπως ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β) που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας και μπορούν να βοηθήσουν στον έλεγχο κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η σύνθεση και η αναδιαμόρφωση αυτής. Άλλοι παράγοντες που εντοπίστηκαν πρόσφατα είναι ο ηπατοκυτταρικός, ο ενδοθηλιακός, ο βήτα νευρικός αυξητικός

παράγοντας κ.α. Οι ποσότητες αυτών κυμαίνονται από περίπου 40 pg έως περίπου 200 ng ανά γραμμάριο ιστού, ωστόσο ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τους άλλους αφού ανιχνεύεται σε ποσοστά 390 ng ανά γραμμάριο ιστού. Οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες ασκούν τα ρυθμιστικά τους αποτελέσματα με αυτοκρινείς ή παρακρινείς μηχανισμούς ενώ ο ινσουλινικός παράγοντας είναι ο μοναδικός που εκτός από παρακρινή και αυτοκρινή δράση μπορεί να απελευθερώνεται σε σημαντικές ποσότητες στην κυκλοφορία του αίματος και να μεταφέρεται σε κύτταρα στόχους που βρίσκονται σε άλλα όργανα. Η θεμέλια ουσία συντίθεται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και υαλουρονικά μόρια που περιβάλλουν τα κύτταρα του ιστού εμποδίζοντας την πρόσβαση των διαλυτών όξινων και βασικών αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Συμπερασματικά λοιπόν προκύπτει πως η συσσώρευση πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων στον ιστό βαρτονείου γέλης, έπειτα από απελευθέρωση και ενεργοποίηση αυτών, προάγει έντονα την βιοσύνθεση κολλαγόνου, υαλουρονικού και θειωμένων πρωτεογλυκανών. Αυτά τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας του ιστού παρέχουν ισχυρή μηχανική αντοχή, ελαστικότητα και υψηλό βαθμό ενυδάτωσης αποτρέποντας έτσι την απόφραξη των ομφαλικών αγγείων (πχ κάμψη ομφάλιου λώρου), στρέψη ή έκταση που προκαλείται από συστολή της (Basiri et al. 2019; Gupta et al. 2020; μήτρας ή από εμβρυϊκή κίνηση Jadalannagari et al. 2017; Malkowski et al. 2007; Sobolewski et al. 2005).

Άλλο σημαντικό συστατικό το οποίο είναι σε μεγάλη ποσότητα είναι οι σφιγγομυελίνες και μια κατηγορία λιπιδίων γνωστά ως κεραμίδια. Το στεατικό οξύ είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ενώ τα επίπεδα των σφιγγοειδών βάσεων είναι μικρότερα από όλα τα παραπάνω συστατικά. Οι τελευταίες καθώς και τα σφιγγολιπίδια είναι βιοδραστικά μόρια που συμβάλλουν στην ρύθμιση μεταγωγής σημάτων σε διάφορες οδούς, στην διαλογή πρωτεϊνών και στην μεσολάβηση από κύτταρο σε κύτταρο για αλληλεπιδράσεις και διαδικασίες αναγνώρισης. Η αλλοίωση μάλιστα του σφιγγολιπιδικού περιεχομένου μπορεί να τροποποιήσει τον μεταβολισμό της βαρτονείου γέλης με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση αυτής με ότι συνέπειες μπορεί να προκύψουν. Τα λιπαρά οξέα που περιέχει χρησιμεύουν ως πηγή ενέργειας για τα κύτταρα και αποτελούν υποστρώματα για την σύνθεση ρυθμιστικών μορίων όπως προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες και λευκοτρίνια. Οι μυοϊνοβλάστες της βαρτονείου γέλης

διεγείρονται από τον παράγοντα TGF, που υπάρχει στον ιστό, παράγοντας έτσι τα κεραμίδια λιπίδια και διεγείροντας τα κύτταρα να παράξουν περισσότερο κολλαγόνο. Εικάζεται πως υψηλές ποσότητες προϊόντων από την αποικοδόμηση σφιγγομυελινών παιζουν σημαντικό ρόλο αν όχι τον κυριότερο για την διέγερση των σπάνιων κυττάρων της βαρτονείου ώστε να παραχθούν μεγάλες ποσότητες των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας του ιστού. Μάλιστα, πιθανολογείται πως τα κεραμίδια λιπίδια, η σφιγγοσίνη και 1φωσφορική σφιγγοσίνη έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας του εν λόγο ιστού. Έτσι, αλλοιώσεις στην λιπιδική σύνθεση του μπορεί να οδηγήσουν στην απορρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της υπερπαραγωγής θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών ή στην υπορύθμιση των ενζύμων που συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες (Romanowicz and Bańkowski 2010).

Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί και αναλυθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός διαλυτών πρωτεϊνών στον ιστό καθεμία από τις οποίες διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε διάφορες διαδικασίες και η παρουσία τους κρίνεται απαραίτητη. Με βάση αυτά σκοπίμως αναφέρονται κάποιες από αυτές: ανθρώπινη λευκωματίνη ορού, διάφοροι τύποι και υπότυποι κολλαγόνου όπως κολλαγόνου τύπου α I, κολλαγόνου τύπου α 2 κ.α., ακτίνη, β-ακτίνη, οστεογλυκίνη, φιμπριονεκτίνη 1, γ αιμοσφαιρίνη και πολλές ακόμη οι οποίες διαμορφώνουν ένα ιδιαίτερο και πολύτιμο βιοχημικό περιβάλλον καθιστώντας τον ιστό της βαρτονείου γέλης σε περίοπτη θέση για πληθώρα εφαρμογών. Μάλιστα, αναγκαία κρίνεται μια μικρή αλλά σημαντική αναφορά στην ύπαρξη και δράση ορισμένων ενζύμων. Η δράση των πρωτεασών ή/και των γλυκοσιδάσεων απελευθερώνει και ενεργοποιεί παράγοντες ανάπτυξης εντός του ιστού ενώ συμπλέγματα της μήτρας ή πρόδρομες μορφές μέσω της δράσης τους δημιουργούν ταχεία και εξαιρετικά εντοπισμένα σήματα. Τέτοια σήματα πιθανολογείται πως διεγείρουν τα κύτταρα της βαρτονείου να παράξουν μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικής μήτρας (Davies et al. 2017; Sobolewski et al. 2005).

Η κύρια δομή της μήτρας του ιστού είναι ελαστική, στέρεα με βάση το κολλαγόνο που σχηματίζει διασυνδεδεμένους πόρους μέσω των οποίων το ιξώδες υγρό μπορεί να κινηθεί όταν ο ιστός είναι συμπιεσμένος. Το διάμεσο υγρό γίνεται ιξώδες από υψηλές διακλαδώσεις πρωτεϊνών που <<αγαπούν>>

το νερό με μεγάλα μόρια. Τόσο το υαλουρονικό οξύ του ιστού όσο και οι πρωτεογλυκάνες είναι μόρια που <<αγαπούν>> το νερό και αντιστέκονται στην συμπίεση. Η υδροφιλική ιδιότητα και η ικανότητα του να παραμένει ενυδατωμένος οφείλεται και εξαρτάται από την συνεχιζόμενη παροχή επαρκών ποσοτήτων γλυκοζαμινογλυκανών, οι οποίες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το νερό στην γύρω περιοχή του διάμεσου υγρού. Οι μεγάλοι πόροι περιβάλλουν τα αγγεία και χρησιμεύουν ως ένας επιπλέον αγγειακός χώρος που διευκολύνει την κίνηση των τοιχωμάτων αυτών κατά την διάρκεια της παλμιτικής αιματικής ροής. Ωστόσο, η πλειοψηφία της έκτασης του χαρακτηρίζεται από πυκνό ιστό με μικρότερους χώρους πόρων και μεγαλύτερη αντίσταση στην συμπίεση. Μέσω του ομφάλιου λώρου γίνεται εξαγωγή του υγρού από την βαρτόνειο ώστε να ανασταλούν υπερβολικά φορτία και η πιθανότητα πρόπτωσης του λώρου από παρατεταμένη συμπίεση (Ferguson and Dodson 2009).

Τέλος, θεμελιώδους σημασίας κρίνεται η παρουσία εξωσωμάτων, κυστίδια με διάμετρο που κυμαίνεται από 30 έως 150 nm, τα οποία δημιουργούνται από αναδιαμόρφωση μεμβρανών του ιστού. Αυτά βρίσκονται σε πολλά υγρά του σώματος όπως στο πλάσμα αίματος, στο αμνιακό υγρό αλλά και στον ιστό βαρτονείου γέλης. Εκκρίνονται από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των βλαστικών και αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό τρόπο ενδοκυτταρικών επικοινωνιών (Gupta et al. 2020).

1.3) ΠΗΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΡΤΟΝΕΙΟΥ ΓΕΛΗΣ

Πηγή απομόνωσης της βαρτονείου γέλης αποτελεί ο ανθρώπινος ομφάλιος λώρος, ο οποίος σχηματίζεται κατά την περίοδο της κύησης μέσα στο σώμα της εγκύου. Τονίζεται το ανθρώπινος ομφάλιος λώρος όχι ως ένδειξη υπερβολής αλλά επειδή ο ομφάλιος λώρος αποτελεί χαρακτηριστικό ιστό σε όλα τα θηλαστικά και περιέχει βαρτόνειο γέλη αλλά και στελεχιαία κύτταρα όπως κι ο ανθρώπινος (Luis Manuel Barrios Arpi 2018). Ο ομφάλιος λώρος ή το νήμα της ζωής δεν είναι απλώς ένας σωλήνας αλλά ένα μοναδικό όργανο με περίπλοκες αρχιτεκτονικές και εξελιγμένες δομές. Το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του είναι πως δεν ελέγχεται η λειτουργία του από κάποιο νεύρο με αποτέλεσμα η ρύθμιση και η διαμεσολάβηση μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου να είναι κυρίως ορμονική. Το ομφάλιο αιμοφόρο αγγείο είναι χωρίς κλαδιά και είναι το μοναδικό σε σύγκριση με τα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία του ενήλικου σώματος. Έχει αμφίδρομη κυκλοφορία με τις αρτηρίες να μεταφέρουν αίμα που αντλείται από την καρδιά μακριά από το έμβρυο ενώ η ομφαλική φλέβα επιστρέφει το αίμα στο έμβρυο από τον πλακούντα. Το επιστρεφόμενο αίμα έχει αναζωογονηθεί με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και στερείται άχρηστων ουσιών ή αλλιώς αποβλήτων. Το πώς συμβαίνει όλο αυτό παραμένει μυστήριο (Fahmy 2018).

Συγκεκριμένα, έχει μήκος συνήθως 40-60 εκατοστά ενώ μπορεί να φτάσει και τα 70 εκατοστά και περίμετρο 1-2 εκατοστά (Davies et al. 2017). Η δύναμη έλξης που δίνεται από το έμβρυο κατά το πρώτο τρίμηνο θεωρείται το κύριο ερέθισμα ανάπτυξης του ενώ σταματά να αναπτύσσεται στο τέλος του δεύτερου τριμήνου. Μάλιστα, το μήκος του δεν αποτελεί απλά ένα στοιχείο καταγραφής καθώς μικρού ή μεγάλου μήκους λώροι μπορεί να σχετίζονται με σοβαρές ανωμαλίες ενώ ακόμη μπορεί να οδηγήσουν μέχρι και στον θάνατο του εμβρύου. Όσο αναφορά το πάχος του μπορεί να φτάσει τα 17 χιλιοστά στο τρίτο τρίμηνο. Λεπτότεροι λώροι από τα φυσιολογικά όρια μπορούν να οδηγήσουν σε προγενέστερες ή μεταγενέστερες γεννήσεις και πιθανολογείται πως οφείλονται σε ανεπάρκεια ιστού βαρτονείου γέλης, ακατάλληλου αριθμού ομφαλικών αγγείων ή δυσανάλογα μεγέθη αυτών. Μάλιστα, χάρις αυτού το έμβρυο έχει την ικανότητα να κινείται κάτι που είναι απαραίτητο για την ορθή ψυχοκινητική του ανάπτυξη (Davies et al. 2017; Krzyżanowski et al. 2019; Taghizadeh et al. 2011).

Η δομή του παρουσιάζεται απλή με εξωτερική κάλυψη από ένα μόνο στρώμα αμνιωτικού επιθηλίου που περικλείει έναν βλεννώδη συνδετικό ιστό μέσω του οποίου διέρχονται τρία αγγεία, μια φλέβα και δύο αρτηρίες. Τα ομφαλικά αγγεία παρέχουν οξυγόνο, αμινοξέα και γλυκόζη στο αναπτυσσόμενο έμβρυο ενώ απομακρύνουν διοξείδιο του άνθρακα και άλλα άχρηστα προϊόντα. Κάθε αγγείο αποτελείται από ένα τοίχωμα λείων μυών και μια ενδοθηλιακή επένδυση. Η σωστή δομή και λειτουργία των ομφαλικών αγγείων και κατ' επέκταση ολόκληρου του ομφαλίου καθορίζουν την πιθανότητα σωστής ανάπτυξης και επιβίωσης του εμβρύου. Τα ομφαλικά αγγεία περιβάλλονται από ιστό βαρτονείου γέλης με μεγάλη ποσότητα εξωκυτταρικής μήτρας. Λόγω αυτού ο λώρος αποκτά ελαστικότητα και αντοχή αποτρέποντας το σχίσιμο, την διάθλαση ή την συμπίεση των αγγείων. Επίσης, δεν διαθέτουν εξωτερικό

χιτώνα όπως παρατηρείται στα καρδιαγγειακά αγγεία με αποτέλεσμα τον ρόλο αυτού να τον παίζει ο ιστός της βαρτονείου γέλης λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων του (Davies et al. 2017; Ferguson and Dodson 2009; Krzyżanowski et al. 2019; Taghizadeh et al. 2011).

Έχουν εντοπιστεί τρείς περιοχές εντός του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου με βάση την διανομή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και των κυτταροσκελετικών χαρακτηριστικών των στρωματικών κυττάρων: η υποαμνιοτική ζώνη, η βαρτόνειος γέλη και τα στοιχεία του φλοιού των αιμοφόρων αγγείων του. Οι τρείς τελευταίες δεν έχουν ορατά δομικά όρια μεταξύ τους. Παρόλο αυτά υποδεικνύονται ως διακριτές μέσω ιστολογικών και ανοσοχρωματικών αναλύσεων. Η βαρτόνειος γέλη καταλαμβάνει τον χώρο ανάμεσα στην εξωτερική επιφάνεια των αγγείων έως και την εσωτερική επιφάνεια του αμνιωτικού επιθηλίου και χαρακτηρίζεται από μικρότερη κυτταρική πυκνότητα σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές. Η περιφερειακή ανατομική δομή του ομφαλίου λώρου χωρίζεται σε έξι ζώνες στο επιθηλιακό αμνιωτικό επιθήλιο, στο υποαμνιωτικό στρώμα, στις λεγόμενες <<σχισμές>> της βαρτονείου γέλης, στο ενδοαγγειακό στρώμα, στο περιαγγειακό στρώμα και στα αγγεία (Davies et al. 2017; G. Jeschke et al. 2011).



Εικόνα 8: Δομή ομφάλιου λώρου με αναπαράσταση της ομφαλικής φλέβας, των ομφαλικών αρτηριών, αμνίον, υποαμνίον, περιαγγειακή περιοχή και ενδοαγγειακή περιοχή. Η βαρτόνειος γέλη βρίσκεται στο υποαμνίον, στην περιαγγειακή περιοχή και στην ενδοαγγειακή (πηγή: Vieira Paladino et al. 2019).

υπόψη πως ο ανθρώπινος ομφάλιος λώρος είναι σχεδόν ίδιος με αυτούς

πολλών θηλαστικών αναφέρει πως αποτελείται από δύο τμήματα το αμνιακό και το αλλαντοϊκό, όπου στο πρώτο βρίσκονται τα ομφαλικά αγγεία ενώ στο δεύτερο υπάρχουν μικρά παρακλάδια αυτών ως πολλαπλά αγγεία και σε εκείνο το τμήμα εκκενώνεται και ο ουράχιος. Μάλιστα, σε ένα σημείο κοντά στο αλλαντοϊκό τμήμα υπάρχει και ένα δίκτυο μικροαγγείων. Η εξωτερική επικάλυψη του λώρου είναι αμνιακό επιθήλιο (απλό πλακώδες) και προσφύεται στενά στην άφθονη θεμελιώδη ουσία του γνωστή ως εμβρυϊκό μεσέγχυμα, η οποία περιέχει μεσεγχυματικό συνδετικό ιστό με κύτταρα και άμορφη ουσία με άφθονο κολλαγόνο (Luis Manuel Barrios Arpi 2018).



Εικόνα 9: Αναπαράσταση της δομής του ομφάλιου λώρου με απεικόνιση των ομφαλικών αρτηριών, της ομφαλικής φλέβας, του βλεννώδη συνδετικού ιστού (βαρτόνειος γέλη), αλλαντοϊκό τμήμα και του δικτύου μικροαγγείων (πηγή: Luis Manuel Barrios Arpi 2018).

Στον άνθρωπο η δημιουργία του ομφάλιου λώρου ξεκινά με την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο τέλος της πρώτης εβδομάδας μετά την γονιμοποίηση και το έμβρυο συνδέεται αρχικά με το ενδομήτριο της μητέρας μέσω του εισβάλοντος τροφοβλάστη. Έτσι, καθώς ο ομφάλιος λώρος αναπτύσσεται περιλαμβάνει ένα εξωτερικό κάλυμμα αμνιωτικού επιθηλίου και ένα συσσωμάτωμα σωματοπλευρικού αμνιακού μεσεγχύματος και άλλων ειδών μεσεγχύματος. Συγκεκριμένα, σχηματίζεται την 26^η ημέρα κατά την οποία το αμνιακό υγρό, το οποίο παράγεται από το μητρικό πλάσμα, περιέχει κυρίως ηλεκτρολύτες και νερό. Αυτό αλλάζει σε όγκο και σύνθεση κατά την διάρκεια της κύησης και κατά περίπου 12 εβδομάδες το υγρό περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια στα οποία προστίθεται η ουρία όταν ξεκινά η

λειτουργία των εμβρυικών νεφρών. Άλλος σημαντικός ρόλος του αμνιακού υγρού είναι ότι προσφέρει θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα της αμνιοτικής μεμβράνης και πέρα από αυτή. Έτσι εκτός από την τροφοδότηση του ομφαλίου με θρεπτικά συστατικά μέσω των αγγείων του, το αμνιακό υγρό αποτελεί μια επιπλέον πηγή συστατικών για τα κύτταρα του ομφαλίου και ιδιαίτερα εκείνων στην υποαμνιοτική περιοχή κάτι που ίσως εξηγεί την μικρή αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας στο εξωτερικό στρώμα τη βαρτονείου γέλης (Davies et al. 2017).

Όσο αναφορά την απομόνωση της βαρτονείου από αυτόν παρατηρείται πως αποτελεί μια όλο και αυξανόμενη χρήση του ως πηγή μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων, που υπάρχουν σε αυτή, για προκλινικές μελέτες και κυρίως πρόσφατα και για κλινικές. Τόσο δομικά όσο και συνθετικά ο ομφάλιος λώρος είναι απλούστερος σε σχέση με τον μυελό των οστών, το λίπος ή τον πλακούντα ενώ τα κύτταρα του θεωρούνται όλο και περισσότερο από την επιστημονική κοινότητα θεραπευτικά. Οι λόγοι που ο ομφάλιος λώρος αποτελεί μια όλο και πιο δημοφιλή πηγή κυττάρων τα οποία αναπτύσσονται για κυτταρικές θεραπείες είναι η μη επεμβατική συγκομιδή από τον ιστό που συνήθως απορρίπτεται κατά τη γέννηση, οι σχετικά υψηλές κυτταρικές αποδόσεις και ο φαινότυπος των κυττάρων που συμπίπτει με εκείνο των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων από άλλες πηγές ιστών. Έτσι, τα εν λόγο κύτταρα χρησιμοποιούνται πλέον σε κλινικές μελέτες στον άνθρωπο ενώ παράλληλα παρέχουν πηγή κυττάρων σε έναν αυξανόμενο αριθμό προκλινικών και βασικών ερευνών. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι επιστημονικές δημοσιεύσεις που υπερθεματίζουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων που προέρχονται από τον ομφάλιο λώρο, επομένως και από την βαρτόνειο, και των πιθανών πλεονεκτημάτων αυτών από τα αντίστοιχα κύτταρα που προέρχονται από άλλους ιστούς (Davies et al. 2017; Krzyżanowski et al. 2019; Taghizadeh et al. 2011).

1.4) Κυτταρικοί πληθυσμοί Βαρτονείου γέλης

Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός είναι τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα που βυθίζονται μέσα στην θεμέλια ουσία του ιστού, τα οποία αποτελούν έναν πολύ ομοιογενή πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος τα διακρίνει από πολλά άλλα
σωματικά βλαστικά κύτταρα. Παρόλο αυτά έχουν βρεθεί και κάποιοι άλλοι πληθυσμοί και υποπληθυσμοί που σε συνδιασμό με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της καθιστούν τον ιστό μοναδικό φυσικό βιοϋλικό. Η κυτταρική πυκνότητα αυτού δεν είναι μεγάλη ωστόσο τα κύτταρα του έχουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού in vitro αλλά και σε κάποιες in vivo εφαρμογές. Η βαρτόνειος γέλη είναι μοναδική μεταξύ των συνδετικών ιστών διότι περιέχει μόνο μεσεγχυματικά κύτταρα που περιλαμβάνουν λειτουργικούς μυοϊνοβλάστες του ιστού και των προδρόμων τους. Δεν έχουν περιγραφεί πολλοί τύποι κυττάρων σε αυτή όπως επίσης δεν υπάρχουν αγγειακά και νευρικά στοιχεία με εξαίρεση τα τρία μεγάλα αγγεία του ομφαλίου. Λόγω της εμβρυικής προέλευσης του ομφαλίου και των πολλαπλών μεσεγχυματικών πηγών που συμβάλλουν στον σχηματισμό του δεν προκαλούν έκπληξη για την ύπαρξη ορισμένων προγονικών πληθυσμών που βρίσκονται σε κάθε περιοχή της αν και ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οι φαινότυποι τους είναι ισοδύναμοι. Λαμβάνοντας υπόψη πως το αγγειακό σύστημα του ομφαλίου είναι η κυρίαρχη παροχή θρεπτικών συστατικών και ότι τα περιαγγειακά κύτταρα μετακινούνται μακριά από το αγγείο τους, βγαίνει το συμπέρασμα πως ίσως η πλειονότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων στην βαρτόνειο προέρχεται από την περιαγγειακή περιοχή. Σε αυτή αναφέρεται πως περιέχεται πάνω από το 45 % των κυττάρων του εν λόγο ιστού. Λόγω αυτού υποστηρίζεται πως η περιοχή αυτή αποτελεί την θέση της πλειονότητας πολλαπλασιασμού των πρόδρομων κυττάρων που οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας της βαρτονείου γέλης στον ομφάλιο λώρο. Μάλιστα, πιθανολογείται πως αποτελεί πλούσια πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων διότι αυτά επιβιώνουν καλύτερα σε περιβάλλον χαμηλού οξυγόνου (Davies et al. 2017; Jadalannagari et al. 2017; Kamal and Kassem 2020; Witkowska-Zimny and Wrobel 2011).

Τα κύτταρα της βαρτονείου γέλης είναι πρωτόγονα μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα παγιδευμένα στην μήτρα του συνδετικού αυτού ιστού καθώς μεταναστεύουν στην περιοχή αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος μέσω του ομφάλιου λώρου κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης (Taghizadeh et al. 2011). Τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται στα βασικά κριτήρια των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που καθιερώθηκαν από την επιτροπή Mesenchymal and Stem Cell της Διεθνούς Εταιρείας Κυτταρικής Θεραπείας το 2006. Προσκολλώνται σε πλαστικό όταν καλλιεργούνται κάτω από συγκεκριμένες

συνθήκες, διαθέτουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα και εκφράζουν τους κατάλληλους επιφανειοδραστικούς δείκτες. Συγκεκριμένα, εκφράζουν τις επιφανειακές πρωτεΐνες CD105 (υποδοχέας), την γλυκοπρωτεΐνη CD73, CD90, CD44, CD29, HLA-ABC, HLA-DR, εκφράζουν ενεργότητα τελομεράσης και GD2 συνθάση και ελλιπή έκφραση του CD34 και CD45, ενώ περιέχουν γονίδιο παραγωγής ινοβλαστών, οι οποίοι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεογενή, χονδρογενή και λιπώδη κυτταρικές γραμμές (Davies et al. 2017; Rachakatla and Troyer 2009; Sobolewski et al. 1997; Taghizadeh et al. 2011; Vieira Paladino et al. 2019; Witkowska-Zimny and Wrobel 2011).

Αναλυτικότερα, λόγω των σπάνιων και πολύτιμων ιδιοτήτων τους εμφανίζουν πολύ χαμηλή ανοσογονικότητα, εκκρίνοντας διάφορες κυτοκίνες, όπως IL-6 και VEGF, ενώ παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα του αντιγόνου λευκοκυττάρων G6 (HLA-G6), 2,3-διοξυγενάση ινδολαμίνης (IDO) και προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Σε ένα φλεγμονώδες περιβάλλον τα κύτταρα αυτά προετοιμάζουν το μικροπεριβάλλον για την επισκευή των ιστών παράγοντας ανοσορυθμιστικά μόρια που ρυθμίζουν την πρόοδο της φλεγμονής, απελευθερώνοντας αυξητικούς παράγοντες για την παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας και διεγείροντας τα in situ προγονικά κύτταρα να διαφοροποιήσουν και να αντικαταστήσουν τα χαμένα κύτταρα, προωθώντας έτσι την αγγειογένεση. Σημαντικότατη ιδιότητα αυτών είναι η ικανότητα τους να εκκρίνουν διάφορες πρωτεΐνες αλλά και η παρακρινική τους δραστηριότητα. Μάλιστα, ενδιαφέρον αλλά ταυτόχρονα πολύ σημαντικό είναι πως ο καρυότυπος τους παραμένει σταθερός παρά τις οποίες εργαστηριακές επεξεργασίες και δεν χάνεται η ικανότητα προσκόλλησης, αναστολής επαφής και της εξάρτησης από τον ορό που είναι χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων ωστόσο δεν προκαλούν καρκινογένεση (Kamal and Kassem 2020; Vieira Paladino et al. 2019).



Ειδικότερα, η χαμηλή ανοσογονικότητα τους οφείλεται στο γεγονός ότι εκφράζουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα τα αντιγόνα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας κατηγορίας 1 (HLA-ABC) ενώ δεν εκφράζουν καθόλου αυτά της κατηγορίας 2 ούτε συνδιεργετικά αντιγόνα, όπως CD80, CD86, που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των Τ και Β κυττάρων του ανοσοποιητικού όλων αυτών παράγουν συστήματος. Εκτός τεράστιες ποσότητες ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών όπως IL-10, TGF-b κ.α., οι οποίες πρόσφατα αποδείχθηκε πως είναι μείζονος σημασίας για την ανοσοκατασταλτική ικανότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ ταυτόχρονα επηρεάζουν όλα σχεδόν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Καταστέλλουν τα CD3, CD4 και CD8 Τ-κύτταρα ενώ μπορούν να καταστείλουν ακόμη και αλλογενή διεγερμένα ανοσοποιητικά κύτταρα. Επιπλέον, αναστέλλουν την ωρίμανση και την

ενεργοποίηση των πρόδρομων δενδριτικών κυττάρων ενώ επηρεάζουν τις λειτουργίες των κυττάρων φυσικοί φονείς, μονοκυττάρων, μακροφάγων, ουδετερόφιλων και των ιστιοκυττάρων (Kamal and Kassem 2020).

Επίσης, οι ερευνητές ανακάλυψαν την ύπαρξη ενός υποσυνόλου βλαστικών κυττάρων που ονομάστηκαν περιγεννητικά βλαστοκύτταρα, τα οποία σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά δεν σχηματίζουν όγκους όταν μεταμοσχευθούν ενώ παράγουν περισσότερα είδη κυττάρων σε σύγκριση με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι προέρχονται από 3 βλαστικά στρώματα και η ιδιότητα αυτή επιτρέπει μεγαλύτερη διαφοροποίηση ιστού (Taghizadeh et al. 2011; Witkowska-Zimny and Wrobel 2011).



Εικόνα 11: Διάγραμμα απεικόνισης των τάξεων των ανθρώπινων στελεχιαίων κυττάρων (πηγή: Witkowska-Zimny and Wrobel 2011).

Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες είναι το βασικό κυτταρικό περιεχόμενο αυτής μετά τα μεσεγχυματικά κύτταρα και έχει διατυπωθεί η άποψη πως ίσως συνεισφέρουν στην ελαστικότητα του ιστού, συνθέτοντας ίνες κολλαγόνου, και ρυθμίζουν την ροή του ομφαλικού αίματος λόγω των συσταλτικών ιδιοτήτων τους. Άλλος σημαντικός πληθυσμός που αναφέρεται είναι τα μαστοκύτταρα. Βρίσκονται πιο συχνά σε περιοχές κοντά στα τρία αγγεία, που καταλαμβάνονται από την βαρτόνειο γέλη, και είναι γνωστά ως παραγωγοί ορισμένων θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών. Μάλιστα, αναφέρεται και η παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων που μπορεί να έχουν αποκολληθεί από τα ενδοθηλιακά όρια των αγγείων του ομφάλιου λώρου. Επίσης, ερευνητές σημείωσαν την ύπαρξη υποπληθυσμού γλυκοπρωτεϊνικώνφωσφορικών κυττάρων στην ροή ταξινόμησης των κυττάρων βαρτονείου γέλης (Davies et al. 2017; Rachakatla and Troyer 2009; Sobolewski et al. 1997).



Εικόνα 12: Μεσεγχυματικό στρωματικό κύτταρο βαρτονείου γέλης κατά την διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κυήσεως (Kobayashi, Kubota, and Aso 1998).

Στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τα εν λόγο κύτταρα κατέχουν υψηλό αριθμό μιτοχονδρίων και καλά ανεπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο με μερικώς διευρυμένες δεξαμενές. Έτσι, τα στρωματικά κύτταρα της Βαρτονείου γέλης ξεκινούν να διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες με πρωτεΐνη ASMA στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Κατά την διάρκεια του τρίτου τριμήνου έχουν σχήμα ατρακτοειδές ή αστεροειδές και έναν πυρήνα επιμήκη ελλειπτικό ή πολυγωνικό. Διαθέτουν μέτρια ποσότητα αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχόνδρια ενώ η συσκευή Golgi σπάνια παρατηρείται. Μέσα στα κύτταρα υπάρχουν μέτριες ποσότητες γλυκογόνου και λιπίδια και οι κυτταρικές επιφάνειες καλύπτονται μερικώς με ένα υλικό που μοιάζει με τη βασική μεμβράνη. Οι δέσμες μικροϊνών παρατηρούνται σε μεταβλητές εκτάσεις στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος (Kobayashi, Kubota, and Aso 1998).

Μία από τις κύριες λειτουργίες των μυοϊνοβλαστών είναι η παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας και συγκεκριμένα κολλαγόνου Ι, ΙΙΙ, ΙV, λαμινίνης και φιμπριονεκτίνης. Ταυτόχρονα τα κύτταρα αυτά μπορούν επίσης να συστέλλονται λόγω της παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων συσπαστικών ινών και συσπαστικών πρωτεϊνών στις δομές τους. Ωστόσο, οι λειτουργίες αυτές

ποικίλουν καθώς οι μυοϊνοβλάστες παρουσιάζουν διάφορες καταστάσεις διαφοροποίησης που κυμαίνονται από όμοια με ινοβλάστη έως λεία μυϊκά κύτταρα (Kobayashi et al. 1998).



Εικόνα 13: Μεσεγχυματικό στρωματικό κύτταρο βαρτονείου γέλης κατά την διάρκεια του δεύτερου τριμήνου της κυήσεως (πηγή: Kobayashi, Kubota, and Aso 1998).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

<u>2.1) Αναγεννητική ιατρική</u>

Ο τομέας της αναγεννητικής ιατρικής εξελίσσεται ταχύτατα ανοίγοντας το δρόμο για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις μέσω κυτταρικών, γονιδιακών και ιστικών θεραπειών που πράγματι αναδιαμορφώνουν το βιοϊατρικό πεδίο. Αποτελεί έναν διεπιστημονικό τομέα που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής και της επιστήμης της ζωής για την προώθηση της αναγέννησης και μπορεί δυνητικά να αποκαταστήσει τραυματισμένους ιστούς αλλά ακόμη και ολόκληρα όργανα. Από την έναρξη του πεδίου πριν από αρκετές δεκαετίες, ορισμένες θεραπείες της έχουν λάβει έγκριση από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), αλλά και από τον αντίστοιχο ευρωπαϊκό φορέα ΕΜΑ, και είναι πλέον διαθέσιμες στο εμπόριο. Ένας από τους βασικότερους λόγους ανάπτυξη της είναι η περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης στους περισσότερους από τους κύριους ιστούς και όργανα αλλά και η τρομερή έλλειψη δοτών οργάνων. Η απώλεια οργάνων και ιστών λόγω ασθενειών και τραυματισμών υπήρξε άλλος ένας σοβαρός λόγος για την ανάπτυξη της από την επιστημονική κοινότητα. Όσο αναφορά τους στόχους της ένας από τους μεγαλύτερους και σημαντικότερους είναι η σύνθεση ανθρώπινων οργάνων για μεταμόσχευση, η in vitro τοξικολογική δοκιμή και η κατανόηση των βασικών μηχανισμών της λειτουργίας των οργάνων (Cupedo, Stroock, and Coles 2012; Feinberg 2012; Kamal and Kassem 2020; Mao and Mooney 2015).

Για την επίτευξη των παραπάνω εγχειρημάτων χρησιμοποιούνται πολλές τεχνικές και μέσα συμπεριλαμβανομένων μορίων, γονιδίων αλλά και βλαστικών κυττάρων ενώ η ιστομηχανική διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο για την επίτευξη της αναγέννησης αλλά και της μεταμόσχευσης οργάνων, καταδεικνύοντας πως οι κατεστραμμένοι ιστοί μπορούν να αντικατασταθούν. Σε όλα αυτά πρωταγωνιστικό ρόλο κατέχουν τα βιοϋλικά και τα κύτταρα που ενσωματώνονται στα μοσχεύματα, το περιβάλλον στο οποίο εμφυτεύεται το μόσχευμα και η ενσωμάτωση του στον ξενιστή. Συγκεκριμένα, η προσοχή έχει στραφεί στην κατασκευή εξελιγμένων μοσχευμάτων, μιμητικών ιστών και τεχνολογιών για την ενσωμάτωση τους με το αγγειακό και το νευρικό σύστημα του ξενιστή. Παράμετροι που ενισχύουν τα εν λόγο εγχειρήματα είναι οι τεχνικές με τις οποίες επιτυγχάνεται ανοσοτροποποίηση στο μικροπεριβάλλον που γίνονται οι μεταμοσχεύσεις καθώς και οι μέθοδοι εκμετάλλευσης των πρόσφατα ανεπτυγμένων κυτταρικών πηγών. Μάλιστα, ο εν λόγο τομέας περιλαμβάνει

επιπλέον <<στρατηγικές>>, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης υλικών και κυττάρων που δημιουργούνται de novo, καθώς και διάφορων συνδυασμών αυτών, για την αντικατάσταση του ιστού που λείπει, αντικαθιστώντας τον αποτελεσματικά τόσο δομικά όσο και λειτουργικά, ή συμβάλλοντας στην επούλωση των ιστών. Η έμφυτη θεραπευτική απόκριση του σώματος μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί για την προώθηση της αναγέννησης, παρόλο που οι ενήλικες άνθρωποι διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης σε σύγκριση με τα κατώτερα σπονδυλωτά. Τα θεραπευτικά κύτταρα που συμβάλλουν άμεσα στη δομή και τη λειτουργία των νέων ιστών είναι ένα βασικό παράδειγμα της αναγεννητικής ιατρικής μέχρι σήμερα. Αυτά χρησιμοποιούνται σε αυτές τις θεραπείες και είναι είτε αυτόλογα είτε αλλογενή και συνήθως αποτελούν διαφοροποιημένα κύτταρα που διατηρούν ακόμη πολλαπλασιαστική ικανότητα. Τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών έχουν δημιουργήσει την αίσθηση πως μελλοντικά θα αντιμετωπιστούν μείζονα και χρόνια ζητήματα επίπονων και θανατηφόρων καταστάσεων όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις κ.α. (Feinberg 2012; Mao and Mooney 2015).



Τα βιοϋλικά είναι ένα σημαντικό συστατικό των τρεχουσών στρατηγικών αναγεννητικής ιατρικής επειδή μπορούν να μιμούνται την φυσική εξωκυτταρική ουσία των ιστών και την κυτταρική συμπεριφορά, συμβάλλοντας στη δομή και τη λειτουργία του νέου ιστού ενώ ταυτόχρονα παρέχουν αυξητικούς παράγοντες. Τα μοναδικά περιβάλλοντα που προκύπτουν από την παρουσία βιοϋλικών, κυττάρων και ιστών οδηγούν σε ξεχωριστές προκλήσεις όσον αφορά την παρακολούθηση και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτών των παρεμβάσεων. Οι τεχνολογίες απεικόνισης για τρισδιάστατη ανάλυση έχουν αναγνωριστεί ως στρατηγική προτεραιότητα στην έρευνα της αναγεννητικής ιατρικής καθώς μέσω αυτών θα λυθούν τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται για κλινική εφαρμογή. Επίσης, οι αποκυτταροποιημένοι ιστοί χρησιμοποιούνται ως ικριώματα για την επούλωση των πληγών ή ως υποκατάστατα ιστών. Μάλιστα, η ενσωμάτωση των αυξητικών παραγόντων που προωθούν την επούλωση ή την αναγέννηση σε βιοϋλικά μπορεί να προσφέρει μια τοπική και διατηρούμενη παρουσίαση αυτών, οδηγώντας σε πολύτιμες αλληλεπιδράσεις που ευνοούν την επούλωση. Ωστόσο, μπορεί να προκύψουν επιπλοκές με αυτές τις στρατηγικές, πιθανώς λόγω του κακού απελευθέρωσης ελέγχου της των παραγόντων. Βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται αυτή την περίοδο σε κλινικές εφαρμογές είναι πλάσμα εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια, αναρρόφηση μυελού των οστών και λιπώδους ιστού κ.α. Οι θεραπευτικές ικανότητες αυτών στηρίζονται στην παρουσία στελεχιαίων κυττάρων, αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών, υαλουρονικού οξέος και εξωκυτταρικών σωματιδίων συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων. Ειδικότερα, η βαρτόνειος γέλη αποτελεί βιοϋλικό, του οποίου το περιεχόμενο χαρακτηρίζεται κατάλληλο για εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική, διότι διαθέτει μια πληθώρα μοναδικών και σπάνιων παραγόντων που αναφέρθηκαν παραπάνω με αποτέλεσμα την δημιουργία ωφέλιμων αλληλεπιδράσεων με τον ξενιστή (Appel et al. 2013; Gupta et al. 2020; Mao and Mooney 2015).



και υλικού ικριώματος δομικά οργανωμένο σε έναν in vivo ιστό που επαναφέρει

την μορφή και την λειτουργία σε ένα όργανο. Το ικρίωμα, που είναι ένα συνθετικό ή φυσικό υλικό, χρησιμεύει στην συγκράτηση των κυττάρων και στην διεύθυνση της λειτουργίας του και αποτελεί απαραίτητο συστατικό για το ιστομηχανικό μόσχευμα. Υπάρχουν τρείς προσεγγίσεις για την δημιουργία ενός ιστομηχανικού μοσχεύματος: α)in vivo μεταμόσχευση ικριώματος με προσέλκυση ενδογενών κυττάρων από τον ξενιστή, β) in vitro ενσωμάτωση κυττάρων στο ικρίωμα πριν την in vivo εμφύτευση του και γ) συνδιασμός αυτών των δύο τεχνικών. Τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται στα ιστομηχανικά μοσχεύματα ιστών ποικίλουν ανάλογα το είδος του ιστού που επισκευάζεται, την τεχνική ενσωμάτωσης των κυττάρων που επιλέγεται και τις απαιτούμενες εμβιομηχανικές ιδιότητες που κρίνονται αναγκαίες για την επίτευξη του εκάστοτε εγχειρήματος. Οι μηχανικές ιδιότητες αναγνωρίζονται ως ιδιαίτερα σημαντικές ενώ άλλες σημαντικές είναι η ελαστικότητα αλλά και η μηχανική συνέχεια μεταξύ φυσικού και ιστομηχανικού ιστού, διότι η ασυμβατότητα μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες βιολογικές αποκρίσεις όπως υπερπλασία κ.α. Οι τεχνικές κατασκευής με βιοϋλικά ποικίλουν και περιλαμβάνουν πηκτώματα ή υδροπηκτώματα, λυοφιλοποιημένα συστατικά, τρισδιάστατα ικριώματα, κ.α. καθώς οι διαδικασίες αυτές βελτιώνουν τον έλεγχο της τοποθέτησης του ικριώματος, το πόσο πορώδες είναι και τις εμβιομηχανικές ιδιότητες ώστε να συμπίπτουν με τις απαιτήσεις της σχετικής κλινικής εφαρμογής. Οι βιοχημικές ιδιότητες και η βιοαποικοδομητική ικανότητα είναι εξίσου σημαντικά χαρακτηριστικά. Έτσι, έχει διατυπωθεί η άποψη πως τα ικριώματα πρέπει να χαρακτηρίζονται από ικανότητα προσκόλλησης κυττάρων σε αυτά, κάτι που συνήθως απαιτεί διατήρηση θέσεων πρόσδεσης ή προσκόλλησης στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (Feinberg 2012).



Άλλη βασική τεχνική της αναγεννητικής ιατρικής είναι η πηγή κυττάρων που θα προσφέρει τα κύτταρα για την ανάπλαση αλλά και ο τρόπος ενσωμάτωσης αυτών στο μόσχευμα, αλλά και του ίδιου του μοσχεύματος στον οργανισμό. Τα είδη κυττάρων που εξετάζονται και είναι πολλά υποσχόμενα είναι τα μεσεγχυματικά, τα εμβρυϊκής προέλευσης βλαστικά κύτταρα και τα πολυδύναμα βλαστικά με προσδοκώμενη ικανότητα χρήσης σε αλλογενή και αυτόλογα ιστομηχανικά μοσχεύματα. Για την επίτευξη αυτών απαιτούνται πολύπλοκες, πολυπαραγοντικές και πολυσυνδιαζόμενες τεχνικές και μεγάλος αριθμός αυτών των κυττάρων. Η στροφή της επιστημονικής κοινότητας σε αυτά, ειδικότερα την τελευταία δεκαετία, οφείλεται στο γεγονός πως έχουν αφήσει το αποτύπωμα τους ως πιθανά <<όπλα>> σε διάφορες εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής λόγω των σπάνιων και πολύ ωφέλιμων χαρακτηριστικών τους. Βέβαια σε όλα αυτά προστίθενται και τα άκρως ενθαρρυντικά δεδομένα από προκλινικές και κλινικές μελέτες αυτών. Εκτός από όλες τις άλλες πηγές αυτών των κυττάρων κρίνεται μοναδική αυτή του ιστού βαρτονείου γέλης από τον οποίο απομονώνεται μεγάλη ποσότητα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων με ιδιαίτερη ευκολία και δίχως να εμπίπτει στους κανόνες βιοηθικής (Atala 2009; Feinberg 2012; Gupta et al. 2020; Kamal and Kassem 2020).

Η ενσωμάτωση του ιστομηχανικού μοσχεύματος στον οργανισμό του ξενιστή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Το περιβάλλον του εμφυτεύματος ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό ή το όργανο που επισκευάζεται και την κατάσταση της ασθένειας. Βασικός στόχος της αναγεννητικής ιατρικής είναι η αποφυγή της απόρριψης του νέου ιστού από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, κάτι που κάνει όλο και πιο σαφές ότι το εν λόγο σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αναγέννησης και συμβάλει στη διαδικασία επούλωσης και εγκατάστασης. Το πιο αρνητικό σενάριο των αντιδράσεων του ανοσοποιητικού είναι η απόρριψη του νέου ιστού ή μοσχεύματος ή ικριώματος, το οποίο αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στην ενσωμάτωση του. Οι ανοσολογικές μελέτες έχουν δείξει υπόσχεση για την πρόκληση ανοχής αλλομοσχεύματος, όπως συμβαίνει με την ανοσοτροποποίηση της απάντησης ανοσοκυττάρων (π.χ. των δενδριτικών κυττάρων και των ρυθμιστικών Τ κυττάρων). Η αλλαγή των ιδιοτήτων των εμφυτευμένων ικριωμάτων μπορεί επίσης να μειώσει την φλεγμονή που συνοδεύει την εμφύτευση ξένου αντικειμένου (Feinberg 2012; Mao and Mooney 2015).





2.2) ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ο άνθρωπος ανέκαθεν είχε την τάση να χειρίζεται τα πράγματα που τον περιβάλουν γύρω του για να ικανοποιήσει τις ανάγκες του και αυτή η τάση αυξήθηκε με την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας, γεγονότα που τον οδήγησαν στην ιδέα να βελτιώσει τις συνθήκες ζωής του. Η ιστομηχανική αποτελεί μια τέτοια ιδέα και έχει οδηγήσει στην επίτευξη σπουδαίων αποτελεσμάτων στις μέρες μας. Στηρίζεται στις αρχές της μηχανικής και της βιολογίας με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη βιώσιμων υποκατάστατων, που θα είναι ικανά να αντικαταστήσουν ή να βελτιώσουν τα κατεστραμμένα ή απόντα λειτουργικά συστατικά των ανθρώπινων ιστών ή οργάνων. Ως κίνητρα ανάπτυξης του εν λόγο τομέα από την επιστημονική κοινότητα υπήρξαν η εμπορευματοποίηση και η επιτυχία αυτής στον δερματικό ιστό με αποτέλεσμα την επέκταση της έρευνας και σε άλλους ιστούς κάτι που θα αποτελέσει βασικό αντικείμενο μελέτης των επιστημών υγείας τους επόμενους αιώνες. Συνεργάζεται με πολλούς επιστημονικούς κλάδους για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος όπως κλινική ιατρική, μηχανολογία, επιστήμη των υλικών, γενετική και βιοεπιστήμες. Ένας από τους βασικότερους λόγους ανάπτυξης της είναι η καταστροφή και ο εκφυλισμός των ιστών που συμβαίνει σε κάθε οργανισμό και η ανοικοδόμηση ή η θεραπεία αυτών, κάτι που αποτελεί μείζων ζήτημα ειδικά αν αναλογιστεί κανείς την μικρή διαθεσιμότητα μοσχευμάτων, τα οποία θα πρέπει να πληρούν πολύ ειδικές προϋποθέσεις τόσο βιοχημικά όσο και ανατομικά. Δυστυχώς, οι τρέχουσες μέθοδοι μεταμόσχευσης και ανασυγκρότησης είναι χρονοβόρες και περιλαμβάνουν πολύ δαπανηρές θεραπείες, όπως η ανοσοκαταστολή, ενώ η έλλειψη δοτών είναι ένα άλλο μεγάλο και δυσεπίλυτο πρόβλημα εκτός από τις σοβαρές παρενέργειες που προκαλούνται από τις θεραπείες δια βίου ανοσοκαταστολής. Έτσι, η ανάπτυξη της ιστομηχανικής θα δώσει σε μεγάλο βαθμό λύση στο εν λόγο πρόβλημα (Mathew et al. 2016).

Ένας ευρύτατα εφαρμοσμένος ορισμός της ιστομηχανικής, όπως διατυπώθηκε από τους Langer και Vacanti, είναι ότι αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής των επιστημών της ζωής προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης βιολογικών υποκατάστατων που επαναφέρουν, διατηρούν ή βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών ή ενός

ολόκληρου οργάνου (Langer and Vacanti 2016). Η λογική που ακολουθείται στην ιστομηχανική για την ανάπλαση ή σύνθεση ιστών μέσω της χρήσης ικριωμάτων είναι η εξής: α) αρχικά, απομονώνονται κύτταρα από μία αλλογενή, ξενογενή ή αυτόλογη πηγή, β) πολλαπλασιάζονται σε μία κυτταρική καλλιέργεια ή με την βοήθεια ενός βιοαντιδραστήρα και έτσι γ)τα κύτταρα που προκύπτουν εμβολιάζονται σε μια μήτρα/φορέα (ικρίωμα) με αποτέλεσμα να παρέχουν δομική υποστήριξη μαζί με την προσθήκη κατάλληλου μέσου (πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες). Σε αυτό το περιβάλλον τα κύτταρα διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στην μήτρα/φορέα για την αντικατάσταση των παλιών ιστών και τον σχηματισμό των νέων. Τέλος, η νέα αυτή <<δομή>> τοποθετείται στον ασθενή για να λειτουργήσει ως ιστός αντικατάστασης. Η λεγόμενη τριάδα της ιστομηχανικής αποτελείται από την συνεργασία των κυττάρων, των ικριωμάτων και των μορίων σήματος, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο για την επίτευξη της ανάπλασης. Συγκεκριμένα, το ικρίωμα χρησιμεύει ως μηχανική πλατφόρμα στην οποία προσκολλώνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται τα κύτταρα. Ένα ιδανικό ικρίωμα προσελκύει και στηρίζει κύτταρα, παρέχοντας έτσι την απαραίτητη μηχανική στήριξη και αρχιτεκτονική, καθώς εκείνα ανασυνθέτουν νέους ιστούς in vitro και in vivo. Οι ιδιότητες ενός ιδανικού είναι: ικριώματος тην αναγέννηση ιστών βιοσυμβατότητα, για βιοδιασπασιμότητα, σε μεγάλο βαθμό πορώδες υλικό και μηχανικές ιδιότητες σύμφωνες και κατάλληλες για την θέση του εμφυτεύματος. Θεραπευτικές επιλογές που λαμβάνουν χώρα την παρούσα φάση στην ιστομηχανική είναι η χρήση αυτομοσχευμάτων ή αλλομοσχευμάτων (Jadalannagari et al. 2017; Mathew et al. 2016).

Η αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο γέλη είναι κατάλληλη για χρήση σε πολλές εφαρμογές του εν λόγο τομέα διότι είναι μια φυσικά βιοσυμβατή μήτρα με ιδιότητες κατάλληλες για την προσκόλληση κυττάρων σε αυτή ενώ διαθέτει και ευνοϊκά χειρουργικά χαρακτηριστικά όπως ελαστικότητα, συμπιεστικότητα ενώ χαρακτηρίζεται σε μεγάλο βαθμό πορώδης, με αποτέλεσμα να καθίσταται εύκολη η διαμόρφωση σε ακανόνιστα ή καμπύλα σχήματα που είναι απαραίτητα για την δομή των ικριωμάτων (Basiri et al. 2019; Jadalannagari et al. 2017). Το τρισδιάστατο περιβάλλον που παρέχει καθιστούν την εν λόγο μήτρα κατάλληλη για την ενίσχυση των in vitro καλλιεργειών μεσεγχυματικών

κυττάρων. Η ποροελαστική συμπεριφορά του ικριώματος, του προσδίδει την ικανότητα να αντέχει τις συμπιεστικές δυνάμεις. Η πληθώρα αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και γενικότερα οι ουσίες που περιέχονται στον ιστό (1.2 Σύσταση βαρτονείου γέλης), συνεργάζονται με τις πρωτεΐνες της εκάστοτε εξωκυττάριας ουσίας ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, σύνθεση και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας. Μάλιστα, βοηθούν και στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των μεταμοσχευμένων μεσεγχυματικών κυττάρων. Η Υαλουρονάνη που υπάρχει στο ιστό εκφράζει ευρέως τον αρχετυπικό υποδοχέα υαλουρονάνης CD44, ο οποίος εκφράζεται σε χονδροκύτταρα, στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού και στα οστεοκύτταρα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να προσκολλώνται στο εν λόγο ικρίωμα. Το γεγονός πως αυτός ο υποδοχέας εκφράζεται και στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα εξηγεί και την προσκόλληση αυτών στην εν λόγο μήτρα (Converse et al. 2018). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του ιστού μοιάζει με εκείνη του χόνδρινου ιστού (Beiki et al. 2018; Lü et al. 2014) αλλά και του δέρματος (Beiki et al. 2018) με αποτέλεσμα ο ιστός να αποτελεί ιδανικό ικρίωμα για ανάπλαση τέτοιου είδους ιστών. Παράλληλα, εκτός από την χρήση του σαν αποκυτταροποιημένο ικρίωμα σε πολλές έρευνες έχει αποδειχθεί η καταλληλότητα του για χρήση του ως <<βάση-υπόστρωμα>> για την ανακαλλιέργεια κυττάρων σε αυτό τόσο in vivo όσο και in vitro (Converse et al. 2018). Επίσης, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και ιδιαίτερα αυτά της βαρτονείου μεσολαβούν στην επισκευή ιστών και οργάνων χάρη στα πολύμορφα δυναμικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης τους, γεγονότα που οδηγούν στην αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες. Επιπλέον, με ειδικότερες μελέτες παρατηρήθηκε πως τα εν λόγω μεσεγχυματικά κύτταρα εγκαθίστανται στην περιοχή της ιστικής βλάβης, ως απάντηση σε αυτή, και συμβάλουν στην προσπάθεια επιδιόρθωσης μέσω της παραγωγής τροφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των κυτοκινών και των αντιοξειδωτικών, στα οποία αποδίδεται η ικανότητα τους να τροποποιούν-ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση στην περιοχή (Kamal and Kassem 2020). Εκτός, από τις ιδιότητες που διαθέτουν από μόνα τους, το γεγονός πως η βαρτόνειος φιλοξενεί και υποστηρίζει τα εν λόγο κύτταρα, την καθιστούν ικανή να υποστηρίξει κι άλλους πληθυσμούς αδιαφοροποίητων στελεχιαίων κυττάρων (Converse et al. 2018). Έτσι,

καθίσταται σαφές πως λόγω των παραπάνω μοναδικών χαρακτηριστικών η βαρτόνειος γέλη αποτελεί περίπτωση εξαιρετικού βιοϋλικού για χρήση σε πληθώρα εφαρμογών της ιστομηχανικής και κατεπέκταση της αναγεννητικής ιατρικής, με ενδείξεις που συνηγορούν πως μελλοντικά είναι πιθανό να προκαλέσει επαναστατικές αλλαγές στους εν λόγο τομείς.

Ένα βασικό συστατικό στην προσέγγιση της ιστομηχανικής είναι ο φορέας, που αποτελεί μια εξαιρετικά πορώδης τεχνητή εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (ECM) ή ικρίωμα που ενεργεί ως πρότυπο για τον σχηματισμό ιστού. Αυτά τα τρισδιάστατα (3D) ικριώματα φιλοξενούν κύτταρα θηλαστικών, ρυθμίζουν και διεγείρουν τις κυτταρικές λειτουργίες της προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της οργάνωσης ιστών και καθοδηγούν την ανάπτυξή τους και την αναγέννηση τους σε τρισδιάστατη μορφή. Ένα ικρίωμα όσον αφορά τόσο τη φυσική δομή όσο και τη χημική σύνθεση θα πρέπει να μιμείται τη δομική και βιολογική λειτουργία της φυσικής εξωκυτταρικής ουσίας όσο το δυνατόν περισσότερο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η φυσική μήτρα όχι μόνο ενεργεί ως φυσική υποστήριξη για κύτταρα αλλά επίσης παρέχει ένα υπόστρωμα με ειδικούς συνδέτες και αυξητικούς παράγοντες έτσι ώστε το κύτταρο να μπορεί να προσκολληθεί και να αναπτυχθεί. Έτσι, μπορούμε να πούμε πως ένα ικρίωμα, που μιμείται κατάλληλα μια φυσική εξωκυττάρια ουσία, διαδραματίζει παρόμοιο ρόλο στην in vitro ιστική αναγέννηση όπως η φυσική εξωκυττάρια ουσία στην in vivo ιστική αναγέννηση. Τα βιοϋλικά χρησιμεύουν ως τρισδιάστατα συνθετικά πλαίσια που συνήθως αναφέρονται ως ικριώματα, μήτρες ή κατασκευές και παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ιστομηχανική. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με υποκατηγορίες αυτών. Ειδικότερα, στα φυσικά, τα οποία με την σειρά τους διαχωρίζονται σε τύπου κολλαγόνου, ελαστικά και υπό μορφή τζέλ, και στα τεχνητά, που διαχωρίζονται σε μεταλλικά, κεραμικά, πολυμερή και συνθετικά. Το καθένα από αυτά με τα δικά του ειδικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.



Βέβαια για να τελέσουν την λειτουργία τους απαιτείται και η εκπλήρωση ορισμένων βασικών προϋποθέσεων-ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, η αντοχή του βιοϋλικού εμφυτεύματος μπορεί να προσδιοριστεί από τις κύριες ιδιότητες και τις αλληλεπιδράσεις με το βιολογικό σύστημα των επιφανειακών ιδιοτήτων σε κάθε ιστό. Σημαντικό επίσης είναι η αλληλεπίδραση βιοϋλικού και βιολογικών συστατικών να μην προκαλεί επιβλαβή αποτελέσματα στα γύρω κύτταρα, τους ιστούς ή τα όργανα ώστε να υλικό να μην είναι αντιγονικό, κυτταροτοξικό, καρκινογόνο, πυρογενές ή τοξικό για τα ζωντανά κύτταρα (Dan et al. 2017; Mathew et al. 2016).

Η επιλογή ενός ικριώματος είναι πολύ σημαντική αναλογιζόμενοι την το ρόλο που διαδραματίζει όπως αναλύθηκε παραπάνω στην ανάπλαση των ιστών. Για αυτό το λόγο η ιδανική επιλογή αυτού στηρίζεται στην παροχή ορισμένων αναγκαίων και σημαντικών ιδιοτήτων. Μια από αυτές είναι το πόσο πορώδες είναι ένα ικρίωμα, διότι η αρχιτεκτονική του θα πρέπει να έχει πολύ καλά διασυνδεδεμένη δομή πόρων. Αυτό εξυπηρετεί την κυτταρική διείσδυση και διάχυση θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα εντός αυτού αλλά και στην εξωκυτταρική ουσία του που σχηματίζεται από τα κύτταρα. Η πορώδης φύση βοηθά ακόμη στη διάχυση των απορριμμάτων και των προϊόντων της αποικοδόμησης αυτών με αποτέλεσμα την έξοδο από το σώμα δίχως παρεμβολές στους γύρω ιστούς ή όργανα. Οι μηχανικές ιδιότητες του βιοϋλικού που χρησιμοποιείται για την κατασκευή ικριωμάτων πρέπει να ταιριάζουν με εκείνες του ιστού-ξενιστή ενώ σημαντική είναι η προσαρμογή αυτών στην απαιτείται να πληρείται είναι η βιοσυμβατότητα καθώς μετά την προετοιμασία του επιθυμητού ικριώματος θα πρέπει να υπάρξει και η επιτυχής ενσωμάτωση του στον ζωντανό οργανισμό. Επίσης, θα πρέπει να βιοαποικοδομείται και τα προϊόντα της βιοαποικοδόμησης να εξαλείφονται πλήρως ώστε οι φυσικοί ιστοί να αναγεννιούνται στην θέση του εμφυτεύματος. Έτσι, τα ικριώματα θα πρέπει να απορροφώνται από τους περιβάλλοντες ιστούς και όχι να αφαιρούνται χειρουργικά ενώ ο ρυθμός υποβάθμισης τους πρέπει να συμπίπτει με αυτόν του σχηματισμού τους. Με αυτό τον τρόπο τα προβλήματα που σχετίζονται με την μακροπρόθεσμη ασφάλεια των μόνιμα εμφυτευμένων ικριωμάτων μπορούν να παρακαμφθούν με την χρήση αποικοδομήσιμων υλικών (Mathew et al. 2016).



(πηγή: Mathew et al. 2016)

Επιπροσθέτως, η ιστομηχανική εμπλέκεται και σε κάποιες μορφές γονιδιακής θεραπείας, μέσω της τοποθέτησης αγγειακών εμφυτευμάτων, που ονομάζονται οργανοειδή ή νέο-όργανα, και χρησιμεύουν ως υποστήριξη στα τροποποιημένα κύτταρα. Αυτό βοηθά στον εντοπισμό, στην προσβασιμότητα του εμφυτεύματος, στην καταγραφή της κυτταρικής επιβίωσης και της προόδου των εμφυτευμάτων ενώ ταυτόχρονα βελτιώνει το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων. Επίσης, σε ασθένειες που ήδη εκκρίνεται η επιθυμητή ουσία στον οργανισμό, αλλά όχι σε επαρκή ποσότητα, η λογική που ακολουθείται είναι η χρήση της ιστομηχανικής με ικριώματα και μήτρες πάνω στις οποίες αναπτύσσονται τα επιθυμητά κύτταρα μέσω των οποίων θα γίνεται η έκκριση ουσίας ή ουσιών που θα βοηθούν στην ασθένεια ή θα προχωρούν στην πλήρη ίαση αυτής (Mathew et al. 2016).

2.3) Αποκυτταροποίηση

Αποκυτταροποιημένοι ιστοί και όργανα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε μια ποικιλία εφαρμογών της ιστομηχανικής και της αναγεννητικής ιατρικής ενώ οι μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται η αποκυτταροποίηση ποικίλλουν ανάλογα με τον ιστό ή το όργανο. Ο κύριος στόχος της αποκυτταροποίησης των ιστών είναι η προσομοίωση της φυσικής θέσης και του μικροπεριβάλλοντος για καλλιέργεια κυττάρων, ώστε να τους φέρει όσο το δυνατόν πιο κοντά στην καλύτερη λειτουργία τους και συγκεκριμένα παρόμοια με αυτή που κάνουν στο σώμα. Η αφαίρεση των κυττάρων από έναν ιστό ή ένα όργανο αφήνει ένα σύνθετο μίγμα δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών που αποτελούν την εξωκυττάρια μήτρα. Οι ιστοί από τους οποίους συλλέγεται η μήτρα, το είδος προέλευσης, οι μέθοδοι αποκυτταροποίησης και οι μέθοδοι αποστείρωσης για αυτά τα βιολογικά ικριώματα ποικίλλει ευρέως. Κάθε μια από αυτές τις μεταβλητές επηρεάζει τη σύνθεση και την υπερδομή της εξωκυττάριας μήτρας και κατά συνέπεια επηρεάζει την απόκριση του ξενιστή στο ικρίωμα μετά την εμφύτευση. Γενικά είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί το πιο ήπιο πρωτόκολλο που πιθανόν να αποδώσει ένα αποκυτταροποιημένο υλικό χωρίς διακοπή της δομικής και λειτουργικής συνιστώσας της μήτρας του ικριώματος (Gilbert, Sellaro, and Badylak 2006).

Με την διεξαγωγή πολλών ερευνών και δοκιμών είναι πλέον σαφές πως οποιαδήποτε μέθοδος αποκυτταροποίησης μπορεί να αποφέρει αλλαγές στην σύνθεση του ικριώματος και στην ανοσοαπόκριση του ξενιστή, γεγονότα που μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην επακόλουθη χρήση για in vitro και in vivo εφαρμογές. Η αφαίρεση συγκολλητικών πρωτεϊνών και γλυκοζαμινογλυκανών από το ικρίωμα μπορεί να επιβραδύνει τη μετανάστευση των κυττάρων σε αυτό και την βιοδραστικότητα του ίδιου του ικριώματος. Διαταραχή του κολλαγόνου δικτύου μπορεί να αλλάξει τη μηχανική συμπεριφορά και να επέλθει αλλαγή στο μηχανικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα. Επίσης, η βιοαποικοδόμηση είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την μηχανική συμπεριφορά και την βιοδραστικότητα του ικριώματος, ιδιότητες που ίσως επηρεαστούν από την

αποκυτταροποίηση. Επιπλέον, οι χημικές επεξεργασίες μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο το ικρίωμα με τρόπο που το καθιστά πιο ευαίσθητο σε ενζυματική βιοαποικοδόμηση in vivo (Gilbert et al. 2006).

Οι φυσικές μέθοδοι, οι χημικοί και οι βιολογικοί παράγοντες, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό για τη λύση των κυττάρων και ακολουθεί η έκπλυση για την απομάκρυνση των κυττάρων. Παράγοντες σημαντικοί που επηρεάζουν την αποκυτταροποίηση και την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για την επίτευξη αυτής είναι η κυτταρική πυκνότητα του ιστού, η πυκνότητα του ίδιου του ιστού, το λιπιδικό περιεχόμενο και το πάχος αυτού (Crapo, Gilbert, and Badylak 2011). Δυστυχώς, έχει παρατηρηθεί πως είναι απίθανο οποιοσδήποτε συνδυασμός μεθόδων να αφαιρέσει το 100% όλων των κυτταρικών συστατικών από έναν ιστό ή όργανο. Ωστόσο, φαίνεται πως οι μέθοδοι που αφαιρούν το μεγαλύτερο ή όλο το ορατό κυτταρικό υλικό έχει ως αποτέλεσμα βιολογικά ικριώματα που είναι ασφαλή για εμφύτευση (Gilbert et al. 2006).

Κάθε αποκυτταροποιητική μέθοδο αλλάζει την εγγενή τρισδιάστατη αρχιτεκτονική της εξωκυττάριας μήτρας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι περιλαμβάνουν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Οι φυσικές μπορεί να περιλαμβάνουν διέγερση ή υπερήχους, μηχανικό μασάζ ή πίεση, κατάψυξη και απόψυξη, διαταράσσοντας την κυτταρική μεμβράνη, διευκολύνοντας έτσι την επακόλουθη έκπλυση και αφαίρεση των περιεχομένων των κυττάρων από την μήτρα. Ωστόσο, κρίνονται ανεπαρκείς και πρέπει να συνδυάζονται και με χημικές μεθόδους. Επειδή, οι ιστοί αποτελούνται τόσο από κυτταρικό υλικό όσο και από εξωκυτταρική μήτρα διατεταγμένα σε μεταβλητούς βαθμούς συμπαγή, ανάλογα με την πηγή προέλευσης του ιστού, κρίνεται απαραίτητο η εξωκυττάρια μήτρα να διαταραχθεί επαρκώς κατά τη διάρκεια της αποκυτταροποίησης, ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής έκθεση όλων των κυττάρων στους παράγοντες και να απομακρύνεται το κυτταρικό υλικό. Βέβαια ταυτόχρονα, σκοπός των περισσότερων διαδικασιών είναι να ελαχιστοποιηθεί η διαταραχή για να διατηρηθούν οι μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες της μήτρας (Gilbert et al. 2006; Keane, Swinehart, and Badylak 2015)

Άλλες κατηγορίες μεθόδων αποκυτταροποίησης είναι οι χημικές και οι βιολογικές. Προτιμώνται διαλύματα δίχως ακραίες τιμές pH, ανάλογα με το είδος του ιστού και την μετέπειτα χρήση. Τέτοια διαλύματα μπορεί να είναι οι

λεγόμενες Αλκαλίνες, που μετουσιώνουν χρωμοσώματα και πλασμιδιακό DNA. Άλλα διαλύματα είναι τα οξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν το DNA από την εξωκυττάρια μήτρα με διαλυτοποίηση κυτταροπλασματικών συστατικών και διαταραχή των νουκλεϊνικών οξέων. Τα εν λόγο διαλύματα είναι αποτελεσματικά για αποκυτταροποίηση σε συνδιασμό με μηχανικές μεθόδους όπως ανάδευση (Keane et al. 2015). Στην ίδια κατηγορία ανήκει η χρήση των μη ιοντικών απορρυπαντικών, όπως το Triton X-100, τα οποία διασπούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίων-πρωτεΐνης. Αντίθετα, тα ιοντικά απορρυπαντικά, όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), είναι αποτελεσματικά για τη διαλυτοποίηση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κυτταρικών μεμβρανών αλλά μετουσιώνουν πρωτεΐνες διακόπτοντας τις τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Άλλη κατηγορία αποτελούν τα αμφιτεριονικά απορρυπαντικά, τα οποία εμφανίζουν τις ιδιότητες των μη ιοντικών και των ιοντικών απορρυπαντικών και έχουν μεγαλύτερη τάση μετουσίωσης πρωτεϊνών από τα μη ιοντικά. Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι το CHAPS. Οι χηλικοποιητές και οι τοξίνες δεσμεύουν δισθενή μεταλλικά κατιόντα σε θέσεις προσκόλλησης κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα και έτσι προκαλείται αποκόλληση αυτών. Μαζί με αυτά χρησιμοποιούνται και EDTA και EGTA για την εξασφάλιση της πλήρης απομάκρυνσης των κυτταρικών πυρήνων με ταυτόχρονη διατήρηση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (Keane et al. 2015; Gilbert et al. 2006).

Στις ενζυματικές μεθόδους αποκυτταροποίησης χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, εστεράσες κ.α. και νουκλεάσες, DNA-ασες, RNAασες. Η χρήση αυτών πλεονεκτεί στο γεγονός της ειδικότητας τους στα βιολογικά υποστρώματα. Όπως και οι άλλες μέθοδοι έτσι και αυτή ανάλογα με την χρήση του ενζύμου υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αλλά και επηρεασμός της εξωκυττάριας μήτρας (Keane et al. 2015).

Οι υποτονικές και υπερτονικές μέθοδοι αποκυτταροποίησης περιλαμβάνουν ωσμωτικό σοκ με υποτονικό ή υπερτονικό διάλυμα και χρησιμοποιούνται για την λύση των κυττάρων σε ιστούς και όργανα. Πρόσθετες ενζυματικές ή χημικές μέθοδοι αναφέρονται ως απαραίτητες (Gilbert et al. 2006).

Επομένως, τα πιο αποτελεσματικά πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης περιλαμβάνουν συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυματικών προσεγγίσεων.

Ένα πρωτόκολλο γενικά ξεκινά με λύση της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας φυσικές μεθόδους ή ιοντικά διαλύματα, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό κυτταρικών συστατικών από την μήτρα, μέσω ενζυματικών μεθόδων. Ακολουθεί η διαλυτοποίηση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κυτταρικών συστατικών, χρησιμοποιώντας απορρυπαντικά, και τέλος η αφαίρεση κυτταρικών υπολειμμάτων από τον ιστό. Αυτά τα βήματα μπορούν να συνδυαστούν με μηχανική ανάδευση για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά τους (Keane et al. 2015; Gilbert et al. 2006).

Επιπροσθέτως, κρίνεται αναγκαίο να τονιστεί πως δεν έχουν οριστεί ποσοτικές μετρήσεις ώστε να χαρακτηριστεί η αποκυτταροποίηση επιτυχής. Βέβαια, με βάση τα ευρήματα μελετών στις οποίες έχει παρατηρηθεί εποικοδομητική in vivo απόκριση αναδιαμόρφωσης καθώς και αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων κυττάρων και ξενιστών αρκεί να πληρούνται τα εξής κριτήρια:

- Η ποσότητα δίκλωνου DNA ανά mg ξηρού βάρους εξωκυτταρικής μήτρας να είναι μικρότερη από 50 ng.
- Το μήκος θραυσμάτων DNA μικρότερο από 200 ζεύγη βάσεων.
- Απουσία ορατού πυρηνικού υλικού έπειτα από χρώση με DAPI ή αιματοξυλίνη-εωσίνη.

Η εστίαση στο νουκλεϊνικό υλικό δικαιολογείται επειδή το DNA συσχετίζεται άμεσα με τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις του ξενιστή. Επιπλέον, η αφαίρεση χημικών υπολειμμάτων ανάλογα με την μέθοδο αποκυτταροποίησης που χρησιμοποιείται αποτελεί άκρως σημαντική διαδικασία, διότι εάν παραμείνουν εντός του ιστού σε υψηλές συγκεντρώσεις τότε είναι πιθανό να είναι τοξικά για τα κύτταρα του ξενιστή όταν το ικρίωμα εμφυτεύεται in vivo (Crapo et al. 2011; Gilbert et al. 2006).

Συμπερασματικά, είναι σημαντικό να υπάρξει ισορροπία μεταξύ της αφαίρεσης των κυτταρικών υλικών και της ζημιάς που προκύπτει στην μήτρα. Με βάση της υπάρχουσες έρευνες εξάγεται το συμπέρασμα πως μια αποκυτταροποιητική διαδικασία κρίνεται επιτυχημένη όταν η φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή είναι ευνοϊκή προς τον αποκυτταροποιημένο ιστό και χαρακτηρίζεται με μικρότερη διόγκωση των περιβαλλόντων ιστών και απουσία σχηματισμού ορού(Keane et al. 2015).



Εικόνα 21: Απεικόνιση όλων των διαδικασιών που περιβάλλουν την αποκυτταροποίηση πριν και μετά από αυτή (πηγή: Chakraborty, Roy, and Ghosh 2020).

2.4) Ανοσιακή απόκριση έναντι αποκυτταροποιημένων δομών

Η έμφυτη και επίκτητη ανοσοαπόκριση του ξενιστή στα εμφυτευμένα ικριώματα και η επίδραση της ανοσολογικής απόκρισης σε μεταγενέστερα γεγονότα ανοσοτροποποίησης είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη. Οι μεταβλητές που επηρεάζουν την απόκριση του ξενιστή περιλαμβάνουν διεργασίες κατασκευής, το ρυθμό αποικοδόμησης ικριώματος και την παρουσία αντιγόνων

διασταυρούμενων ειδών. Το χρονικό διάστημα που τα ικριώματα εκτίθενται στους ξενιστές επηρεάζει τον τύπο της ανοσοαπόκρισης που θα προκληθεί. Έχει παρατηρηθεί πως το βιολογικό υλικό ικριώματος, όταν δεν είναι χημικά διασυνδεδεμένο, να βιοαποικοδομείται γρήγορα μετά την εμφύτευση. Περίπου το 60% της μάζας του βιοαποικοδομείται και απορροφάται εντός 4 εβδομάδων μετά την εμφύτευση ενώ η πλήρης αποδόμηση συμβαίνει συνήθως έπειτα από 3 μήνες. Ανεξάρτητα από τα χαρακτηριστικά ενός ικριώματος, ο τελικός καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας είναι η απόκριση του ξενιστή στο ικρίωμα μετά την εμφύτευση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων ξενιστή (παραλήπτη) και εξωκυττάριας μήτρας αποτελεί την αρχή του παντός. Στην πραγματικότητα, η τελευταία επηρεάζει έντονα τον φαινότυπο και την συμπεριφορά των κυττάρων, ενώ τα κύτταρα, με τη σειρά τους, αποδομούν και αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια μήτρα. Αυτή η αμοιβαία διαδικασία είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη ιστών, την ομοιόσταση και την επούλωση πληγών. Ως γνωστόν η σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας παραμένει σταθερή στο μεγαλύτερο ποσοστό της μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τους οποίους τα ικριώματα χαρακτηρίζονται εξαιρετικά βιοδραστικά. Ωστόσο, η ανοσοαπόκριση έναντι αυτών είναι κατανοητή μόνο εν μέρει. Η ανοσοαπόκριση και ειδικότερα η έμφυτη, είναι σε μεγάλο βαθμό καθοριστική για το κλινικό αποτέλεσμα. Οι βιοκαλύψεις των εξωκυτταρικών μητρών στερούνται κυττάρων και τα περισσότερα υπολείμματα αυτών, και επειδή η μεγάλη πλειοψηφία των αντιγονικών επιτόπων σχετίζονται με τα κύτταρα, η αποκυτταροποίηση θα πρέπει ιδανικά να οδηγήσει σε ικριώματα αποτελούμενα κυρίως από συστατικά της μήτρας (Costa et al. 2017; Cravedi et al. 2017; Badylak and Gilbert 2008).



Όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενη υποενότητα τα ικριώματα υποβάλλονται σε μεθόδους επεξεργασίας όπως η αποκυτταροποίηση για την απομάκρυνση ή την κάλυψη αντογονικών επιτόπων, DNA και μορίων μοριακού μοτίβου που σχετίζονται με βλάβη. Σε μια πρόσφατη μελέτη που συνέκρινε διάφορα ικριώματα, που περιλαμβάνουν εξωκυττάρια μήτρα και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαφορετικές μεθόδους, η οξεία απόκριση του ξενιστή χαρακτηριζόταν ομοιόμορφα από έντονη μονοπύρηνο-κυτταρική διήθηση. Ωστόσο, μακροπρόθεσμη ανοσοδιαμορφωτική απόκριση διέφερε n ποικιλοτρόπως από χρόνια φλεγμονή, ίνωση, ουλές και ενθυλάκωση έως σχηματισμό οργανωμένων και κατάλληλων αναδιαμορφωμένων ιστών. Καθίσταται λοιπόν σαφές πως οι βιολογικοί μέθοδοι κατασκευής ικριωμάτων παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της απόκρισης του ξενιστή. Τα περισσότερα βιολογικά ικριώματα μετά την αποκυτταροποίηση τους περιέχουν ίχνη υπολειπόμενου DNA, υπό την μορφή μικρών θραυσμάτων κάτι που μειώνει κατά πολύ την πιθανότητα να διαδραματίσουν ουσιαστικό ρόλο σε μια ανεπιθύμητη απόκριση αναδόμησης Στις TOU ιστού. περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες τα θραύσματα αυτά είναι μικρότερα από 300 ζεύγη

βάσεων σε μήκος και έχει αξιολογηθεί πως δεν αποτελούν αιτία ανησυχίας για ανοσολογική απόκριση εναντίον τους. Αυτό συμβαίνει διότι υποβάλλονται σε ταχεία βιοαποικοδόμηση μετά την in vivo τοποθέτηση τους μέσω ενζυματικών κατεργασιών (Badylak and Gilbert 2008).

Η απόκριση του ξενιστή ενάντια σε ικριώματα που αποτελούνται από εξωκυττάρια μήτρα περιλαμβάνει τόσο το έμφυτο όσο και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα και επηρεάζεται από συγκεκριμένες μεταβλητές συμπεριλαμβανομένων την προβλεπόμενη κλινική εφαρμογή, το είδος ιστού από τον οποίο προέρχεται το ικρίωμα και η μέθοδος αποκυτταροποίησης. Ανάλογα λοιπόν με αυτά τα αποτελέσματα ερευνών δείχνουν διαφορές στην οξεία και χρόνια κυτταρική απόκριση του ξενιστή και στα μεταγενέστερα αποτελέσματα της αναδιαμόρφωσης του ιστού. Συγκεκριμένα, η ένταση της απόκρισης των κυττάρων καθώς και η χρονική και χωρική κατανομή αυτής διαφέρει ανάλογα το βιοϋλικό του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου ικριώματος. Ενδεικτικά μια οξεία κυτταρική απόκριση αποτελείται από πολυπύρηνα γιγαντιαία κύτταρα και παρατηρείται στην χειρουργική περιοχή όπου γίνεται η εμφύτευση. Άλλες μορφές απόκρισης χαρακτηρίζονται από κύτταρα ουδετεροφιλικού τύπου ενώ συχνά αναφέρονται κι άλλες με κυρίως μονοπυρηνική απόκριση. Γενικώς αυτό που ισχύει είναι ότι η μονοπυρηνική απόκριση ακολουθείται από προσέλκυση ουδετερόφιλων κυττάρων στην θέση φλεγμονής με την πάροδο του χρόνου, έπειτα γίνεται φαγοκυττάρωση των κυτταρικών συντριμμιών και ξένων υλικών και τελικά γίνεται έξοδος όλων από την θέση της φλεγμονής. Ωστόσο, το μοτίβο της ανοσολογικής απόκρισης αλλά και της αναδιαμόρφωσης διαφέρουν σημαντικά για κάθε ικρίωμα εξωκυττάριας μήτρας κάτι που φανερώνει την πολυπλοκότητα του εγχειρήματος της ιστομηχανικής και της αναγεννητικής ιατρικής (Badylak and Gilbert 2008).

Γενικά, τα συνθετικά βιοϋλικά προκαλούν ανοσολογική αντίδραση ίδια με εκείνη ξένου σώματος στον οργανισμό, προκαλώντας το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, όπου τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι οι κυριότεροι συντελεστές. Τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του βιοϋλικού και η σύνθεσή του επηρεάζουν την πορεία και την έκταση της ανοσολογικής αντίδρασης. Οι επίπεδες και λείες επιφάνειες γενικά οδηγούν στο σχηματισμό ίνωσης, ενώ τα εμφυτεύματα με τραχιά επιφάνεια καλύπτονται από ένα στρώμα μακροφάγων και γιγαντιαίων κυττάρων με μεταβλητές ποσότητες κοκκιώδους ιστού, που

μπορούν να παραμείνουν γύρω από το εμφύτευμα και ενδεχομένως να το απομονώσουν από τον τοπικό ιστό. Τα μονοπύρηνα κύτταρα εισβάλλουν στο χώρο του εμφυτεύματος ήδη από τις πρώτες 24 ώρες. Βέβαια, η αρχική φάση της αντίδρασης ξένου σώματος ξεκινά με την ενεργοποίηση της πήξης και των αλληλουχιών συμπληρώματος, που τελικά οδηγεί σε διείσδυση ουδετερόφιλων και μετά από 2-3 ημέρες σε μακροφάγα. Στη συνέχεια, τα μακροφάγα δρουν ως τα κύρια ρυθμιστικά κύτταρα, ενεργοποιώντας κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα είναι τα τελευταία κύτταρα που ενεργοποιούνται, φτάνοντας στην καθυστερημένη φλεγμονώδη περίοδο 72 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης ξένου σώματος. Το τελικό στάδιο είναι η επούλωση των ιστών στη θέση της εμφύτευσης και καλείται αποκατάσταση, δηλαδή λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του συνδετικού ιστού και ο σχηματισμός μιας ινώδους κάψουλας. Τα φυσικά βιοϋλικά που αποτελούνται από κολλαγόνο, γλυκοζαμινογλυκάνες κ.α. μιμούνται συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και είναι λιγότερο ανοσογόνα. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση, προκαλώντας μονοκύτταρα тα να απελευθερώσουν ιντερλευκίνες (IL) -1B και IL-6. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως η απόκριση του ξενιστή μετά την εμφύτευση οποιουδήποτε βιοϋλικού ακολουθεί το φαινόμενο Vroman, ακολουθούμενο από ενεργοποίηση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων, των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων. Μάλιστα, ανάλογα με το εμφυτευμένο υλικό, συμβαίνει επίσης ενεργοποίηση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο περιλαμβάνει λεμφοκύτταρα (κύτταρα T και B) (Costa et al. 2017; Cravedi et al. 2017; Keane and Badylak 2015).

επόμενη διαδικασία που ακολουθεί είναι Н σημαντική ŋ βιοαποικοδόμηση της βιοκάλυψης της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία μπορεί να προκληθεί από τη δράση των πρωτεασών που υπάρχουν στον τραυματισμένο ιστό ή εκκρίνεται από κύτταρα που αποκρίνονται. Ο ρυθμός της πιθανότατα εξαρτάται και από τον ανατομικό τόπο τοποθέτησης. Η βιοαποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας είναι απαραίτητη για να οδηγήσει τη φλεγμονώδη απόκριση προς την υποχώρηση, αποφεύγοντας την παρουσία ενός χρόνιου φλεγμονώδους σεναρίου. Προϊόντα αυτής, που παράγονται κατά την αναδιαμόρφωση ιστών, αποκαλούνται κρυπτικά πεπτίδια, και μαζί με την

απελευθέρωση κι άλλων ουσιών που κατακρατήθηκαν στην μήτρα, πιστεύεται πως είναι υπεύθυνα για πολλές πτυχές της βιοδραστικότητας της εξωκυττάριας μήτρας. Οι μηχανισμοί με τους οποίους διευκολύνεται η εποικοδομητική και προκύπτουν τα ευνοϊκά αναδιαμόρφωση κλινικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν την απελευθέρωση ή τη δημιουργία μορίων τελεστών που βλαστικά/προγονικά προσλαμβάνουν ενδογενή κύτταρα θέση στη τοποθέτησης των ικριωμάτων και ρυθμίζουν την έμφυτη ανοσοαπόκριση. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση ενός είδους αντιφλεγμονώδων μακροφάγων (Costa et al. 2017; Keane and Badylak 2015).

Αναλυτικότερα όσο αναφορά την έμφυτη ανοσολογική απόκριση έναντι των ικριωμάτων, ο προφλεγμονώδης, κυτταροτοξικός φαινότυπος των μακροφάγων, αναγράφεται ως Μ1, και χαρακτηρίζεται από κύτταρα που προάγουν την θανάτωση παθογόνων και κύτταρα που σχετίζονται με φλεγμονή και ιδιαίτερα χρόνια φλεγμονή. Αντίθετα, ο αντιφλεγμονώδης φαινότυπος των μακροφάγων, αναγράφεται ως Μ2, και προάγει την ανοσορύθμιση, την επισκευή καθώς και την εποικοδομητική αναδιαμόρφωση των ιστών. Τα Μ1 μακροφάγα κύτταρα παράγουν τεράστιες ποσότητες προφλεγμονώδων κυτοκινών, όπως IL-12, ενώ τα M2 υψηλά επίπεδα IL-10 και η έκφραση του παράγοντα TGF αναστέλλουν την απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτοκινών, κυτταρικών υπολειμμάτων και προωθούν την αγγειογένεση και την πρόσληψη κυττάρων για την εποικοδομητική αναδιαμόρφωση των ιστών. Η μετάβαση του φαινοτύπου του μακροφάγου από Μ1 σε Μ2, καταστέλλει και περιορίζει το προφλεγμονώδες μικροπεριβάλλον και διευκολύνει τα συμβάντα εποικοδομητικής επούλωσης πληγών. Η απουσία αυτής της μετάβασης οδηγεί σε επίμονη και χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση (Costa et al. 2017; Keane et al. 2012; Badylak and Gilbert 2008).



Επιπλέον, στην εν λόγο ενότητα σημαντική κρίνεται η αναφορά στον ρόλο των Τ λεμφοκυττάρων και ειδικότερα στα Th1 και Th2, που αποτελούν μέρος της προσαρμοστικής ανοσίας. Τα Th1 παράγουν κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνη-2, ιντερφερόνη και παράγοντα νέκρωσης όγκου που οδηγεί στην ενεργοποίηση μακροφάγων, διέγερση ισότυπων αντισωμάτων στερέωσης συμπληρώματος και διαφοροποίηση CD8+ κυττάρων με κυτταροτοξικό φαινότυπο. Η ενεργοποίηση αυτών σχετίζεται με απόρριψη μοσχευμάτων τόσο αυτόλογης όσο και αλλογενούς προέλευσης. Τα Th2 λεμφοκύτταρα παράγουν κυτοκίνες IL-4, IL-5, IL-6 και IL-10, που δεν ενεργοποιούν μακροφάγα κύτταρα, και οδηγούν σε παραγωγή ισότυπων αντισωμάτων στερέωσης χωρίς συμπλήρωμα. Η δραστηριοποίηση αυτής της οδού των Th2 πραγματοποιείται σε περιπτώσεις αποδοχής μοσχευμάτων (Badylak and Gilbert 2008).



Τέλος, ιστοί προερχόμενοι κυρίως από μη πρωτεύοντα θηλαστικά και πίθηκους του «Νέου Κόσμου», παρότι έχουν εμφανείς ανατομικές ομοιότητες και μπορούν να αποτελέσουν υποψήφια πηγή αποκυτταροποιημένων οργάνων, εντούτοις η παρουσία των επιτόπων α-gal κρίνεται απαγορευτική για την χρήση αυτών για μεταμόσχευση. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας των αντι-Gal αντισωμάτων στον ανθρώπινο οργανισμό, οδηγώντας έτσι σε οξεία απόρριψη των οργάνων που προέρχονται από τα συγκεκριμένα ζωικά πρότυπα (Keane and Badylak 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1) Εφαρμογές βαρτονείου γέλης

Η βαρτόνειος γέλη αποτελεί ένα μοναδικά πολύτιμο φυσικό βιοϋλικό το οποίο βρίσκει εφαρμογές σε πολλές περιπτώσεις, όπως ιστικές, γονιδιακές και κυτταρικές θεραπείες, λόγω των μοναδικά εξαιρετικών και σπάνιων ιδιοτήτων της τόσο ως ικρίωμα για χρήση του στην αναγεννητική ιατρική όσο και για την σύσταση και το κυτταρικό περιεχόμενο του. Όπως αναλύθηκε διεξοδικώς σε προηγούμενο κεφάλαιο περιέχει μοναδικά συστατικά που προκαλούν ευνοϊκές αντιδράσεις στην ανάπλαση ιστών (ανοσοτροποποίηση, παροχή αυξητικών παραγόντων και έκκριση πολύτιμων κυτταροκινών), αποτελώντας αντικείμενο επιστημονικής μελέτης που ίσως λύσει πολλά ιατρικά ζητήματα. Στο ίδιο επίπεδο κυμαίνεται και το κυτταρικό του περιεχόμενο με αποτέλεσμα ο εν λόγο ιστός να δημιουργεί ένα μοναδικό βιοχημικό και μηχανικό περιβάλλον. Έτσι, βρίσκει εφαρμογές άμεσα σαν ιστός (ικρίωμα) στην ιστομηχανική αλλά και έμμεσα, εκμεταλλευόμενοι το μεσεγχυματικό κυτταρικό περιεχόμενο του και την σύσταση του, προκαλώντας ευεργετικές αντιδράσεις με ενδεχόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα (Basiri et al. 2019; Rachakatla and Troyer 2009; Taghizadeh et al. 2011).

Μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή της βαρτονείου γέλης στο πλαίσιο της ιστομηχανικής και κατ' επέκταση στην αναγεννητική ιατρική είναι η δημιουργία υδροπηκτωμάτων από εκχύλισμα αποκυτταροποιημένου ιστού βαρτονείου και Ινδροΐνης (διαθέτει κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες για επιδιόρθωση του χόνδρου στις αρθρώσεις). Η βαρτόνειος χρησιμοποιείται σε τέτοιες περιπτώσεις λόγω της ομοιότητας της σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας με τον αρθρικό χόνδρο. Το αποτέλεσμα με βάση τα δεδομένα που προκύπτουν είναι πως η αποκυτταροποιήμενη βαρτόνειο μέσα σε υδροπηκτώματα ενισχύει τις μηχανικές ιδιότητες του πηκτώματος για ανάπλαση του χόνδρου σε σχέση με τα καθαρά πηκτώματα Ινδροΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας είναι παρόμοια με αυτή του αρθρικού χόνδρου και ειδικότερα στην ολική πρωτεΐνη, στο διαλυτό, αδιάλυτο και ολικό κολλαγόνο, στον παράγοντα TGF-β1 και στις γλυκοζαμινογλυκάνες και οι ποσότητες αυτών και της Ινδροΐνης προσδιορίζονται για την παρασκευή του καλύτερου εκχυλίσματος μέσα σε κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα ώστε να επιτευχθεί η βιωσιμότητα των ανθρώπινων ενδομήτριων στελεχιαίων κυττάρων. Η έρευνα αυτή έδειξε ενδυνάμωση της Ινδροΐνης προσθήκη aμ тην αποκυτταροποιημένης βαρτονείου μέσω της εκμετάλλευσηw των ωφέλιμων ιδιοτήτων (τόσο των μηχανικών όσο και της παρόμοιας βιοχημικής σύνθεσης με την εξωκυττάρια μήτρα του χόνδρου) με σκοπό την ανάπτυξη μιας νέας χόνδρινης ιστικής δομής. Επομένως, μελλοντικά είναι πιθανό το πήκτωμα αυτό να χρησιμοποιηθεί για αναγέννηση χόνδρινου ιστού (Basiri et al. 2019). Με δεδομένη την χαμηλή αυτό-ικανότητα επισκευής χόνδρου σε περίπτωση βλάβης διεξήχθη έρευνα για την in vitro κατασκευή υποστηρικτικής δομής για

την ανάπτυξη αυτόλογων χονδροκυττάρων με την χρήση βιοϋβριδικού σύνθετου ικριώματος. То ικρίωμα αποτελείται ٤٧ λόγο από αποκυτταροποιημένη εξωκυττάρια μήτρα βαρτονείου γέλης με συνθετική υδρογέλη πολυβινυλικής αλκοόλης, η οποία διαθέτει βιομηχανικές ιδιότητες. Τα αποτελέσματα της έρευνας είναι ενθαρρυντικά καθώς απέδειξαν πως το ικρίωμα αυτό προάγει την προσκόλληση χονδροκυττάρων και πως μελλοντικά με περαιτέρω πειράματα και βελτιώσεις είναι πιθανό ο εν λόγο συνδιασμός να αποτελέσει ένα καινοτόμο και εύκολα διαθέσιμο ικρίωμα για την αποκατάσταση χόνδρινου ιστού (Stocco et al. 2014). Έτσι, η μελέτη αυτή διευρύνει το φάσμα εφαρμογών της βαρτονείου γέλης ως ικρίωμα στην ιστομηχανική, διότι ανοίγει έρευνα, που αφορά τον δρόμο για περαιτέρω TOV συνδυασμό αποκυτταροποιημένων ικριωμάτων αυτής με συνθετικές ουσίες, ώστε να συμβεί η εκάστοτε επιδιωκόμενη ανάπλαση ιστού.

Η βαρτόνειος γέλη έχει χαρακτηριστεί από τους ερευνητές ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική πηγή φυσικού βιοϋλικού για χρήση σε εφαρμογές της ιστομηχανικής. Βέβαια, για να συμβεί αυτό πρέπει να βελτιστοποιηθεί ο τρόπος διατήρησης του ιστού για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να είναι άμεσα διαθέσιμος για την εκάστοτε χρήση είτε ως τρισδιάστατο ικρίωμα είτε ως πηγή μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων για χρήση σε εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής. Η διεξαγωγή μίας ενδιαφέρουσας έρευνας, που έλαβε χώρα στο εργαστήριο της ελληνικής τράπεζας ομφαλοπλακουντιακού αίματος υπό τους ερευνητές p.mallis et al., πρότεινε ως πιθανή λύση την κρυοσυντήρηση με υαλοποίηση (μέθοδος ταχείας κατάψυξης με την χρήση κρυοπροστατευτικών παραγόντων) και αποθήκευση του εν λόγο ιστού, με συγκεκριμένη διαδικασία, σε χαμηλές θερμοκρασίες και συγκεκριμένα στους -196°C για ένα ολόκληρο έτος. Η ιστολογική ανάλυση έδειξε παρουσία-διατήρηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας TOU ιστού και συγκεκριμένα TOU κολλαγόνου, θειικών των γλυκοζαμινογλυκανών αλλά και την παρουσία κυτταρικών πυρήνων στα υαλοποιημένα δείγματα του ιστού. Ταυτόχρονα τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον υαλοποιημένο ιστό επεκτάθηκαν επιτυχώς και διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα όπως αναμένεται από τις ιδιότητες που κατέχουν. Μάλιστα, διατήρησαν τον αναμενόμενο ανοσοφαινότυπο τους. Τα αποτελέσματα αυτά

οδηγούν στο συμπέρασμα πως η εν λόγο μέθοδος υαλοποίησης του ιστού διατηρεί με επιτυχία την δομή της εξωκυττάριας ουσίας του και τα κύτταρα που διαθέτει μετά από ένα έτος αποθήκευσης του. Έτσι, συνάγεται το συμπέρασμα πως ο υαλοποιημένος ιστός βαρτονείου γέλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων και να εφαρμοστεί σε προσεγγίσεις της ιστομηχανικής (Mallis et al. 2020).

Επιπλέον, πειράματα σε ποντίκι εργαστηρίου υποδείξαν πως η αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο γέλη προσελκύει in vivo κύτταρα για οστική αναγέννηση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με ελαττωματικό εγκεφαλικό στέλεχος και σημασμένα οστεοκύτταρα με φθορίζουσα πρωτεΐνη και αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο γέλη. Η εξωκυττάρια αυτή μήτρα εμφανίστηκε άθικτη 14 ημέρες μετά την χειρουργική επέμβαση και η ιστολογική εξέταση αποκάλυψε την παρουσία οστεοκυττάρων μέσω της σήμανσης τους με την πρωτεΐνη. Τα κύτταρα αυτά μάλιστα παρατηρήθηκαν ήδη από τις πρώτες 24 ώρες ενώ συγκρίνοντας αυτά με τα οστεοκύτταρα που σημάνθηκαν μέσω ανοσοϊστοχημείας έπειτα από 14 μέρες, έγινε αντιληπτό πως οστεοκύτταρα από то γειτονικό οστό μετανάστευσαν στην αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο σε ένα διάχυτο πρότυπο. Επίσης, το σύστημα απεικόνισης ζωντανών ζώων έδειξε έλλειψη πράσινου σήματος, δηλαδή οστεοκυττάρων, στην ελαττωματική περιοχή σε ποντίκια που δεν εισήχθη η αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο ενώ σε αυτά με αυτήν το σήμα ήταν έντονο. Από όλα αυτά καθίσταται σαφές πως η αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο γέλη ενεργεί ως χημικό-ελκυστικό και βιοσυμβατό υλικό ικριώματος για την αποκατάσταση βλαβών από οστεοκύτταρα και γενικώς χονδροκύτταρα. Η μελέτη αυτή λοιπόν εδραίωσε το συμπέρασμα πως ο εν λόγο αποκυτταροποιημένος ιστός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρισδιάστατο πορώδες, βιοδραστικό και βιοσυμβατό ικρίωμα για εφαρμογές ιστομηχανικής και αναγεννητικής ιατρικής διότι αποτελεί έναν βλεννοειδή συνδετικό ιστό που διαθέτει πολλά μοναδικά βιοχημικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για ένα ικρίωμα (Jadalannagari et al. 2017). Στην παραπάνω μελέτη έρχεται να προστεθεί άλλη μια ελπιδοφόρα έρευνα στην οποία αποδείχθηκε η καταλληλότητα του αποκυτταροποιημένου ικριώματος βαρτονείου γέλης για in vitro ανάπτυξη των μεσεγχυματικών που προέρχονται από βαρτόνειο, τα οποία διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκύτταρα. Μάλιστα, η προσκόλληση, η διείσδυση

και η μετανάστευση αυτών στο ικρίωμα χαρακτηρίστηκε ικανοποιητική. Η εν λόγο μελέτη λοιπόν κατέληξε στο συμπέρασμα πως το αποκυτταροποιημένο σπογγώδες ικρίωμα βαρτονείου γέλης είναι κατάλληλο για οστεογενή διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βαρτονείου γέλης, πιθανόν λόγω ενεργοποίησης ιντεγκρινών και της συμβατικής ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Beiki et al. 2018).

Επιπροσθέτως, έρευνα που διεξήχθη αναφέρει πως το ικρίωμα βαρτονείου γέλης από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο ευνοεί την in vitro πρόσφυση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση των χονδροκυττάρων σε αυτό, καθώς διαθέτει ευνοϊκή συγγένεια και συμβατότητα κυττάρων. Ειδικότερα, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο ικρίωμα είχαν το επιθυμητό σχήμα και παρατηρήθηκαν ομοιόμορφα πάνω σε αυτό. Μάλιστα, μεγάλος αριθμός κυττάρων παρατηρήθηκε στους πόρους μεταξύ των ικριωμάτων. Στα θετικά προστίθενται πως τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και εκκρίνανε μεγάλη ποσότητα εξωκυττάριας μήτρας σε μόλις 7 ημέρες και πως το ικρίωμα αυτό μπορεί να καθοδηγήσει πολλαπλασιασμό τον και тην μετανάστευση τους αποτελεσματικά. Οι εκτιμήσεις βιωσιμότητας των κυττάρων τρείς ημέρες μετά την καλλιέργεια δείχνουν πως τα περισσότερα από τα προσκολλημένα κύτταρα είναι ζωντανά και συγκεκριμένα η βιωσιμότητα υπολογίσθηκε σε περισσότερο από 90%. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ομοιόμορφη κατανομή χονδροκυττάρων στο ικρίωμα κατά μήκος των πόρων αυτού και υπερβολικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών. Έτσι, και αυτή η έρευνα δείχνει πως η βαρτόνειος γέλη αποτελεί ιδανικό ικρίωμα κατασκευής χόνδρινου ιστού (Lü et al. 2014).

Ωστόσο, οι εφαρμογές της ιστομηχανικής χρησιμοποιώντας την βαρτόνειο γέλη ως αποκυτταροποιημένο ικρίωμα για ανάπλαση ιστών δεν σταματούν εδώ. Σε έρευνα που διεξήχθη σχεδιάστηκε βιομιμητικό σπογγώδες ικρίωμα από αποκυτταροποιημένη βαρτόνειο και χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο δέρματος με επιτυχία. Άλλωστε, η εξωκυττάρια μήτρα της βαρτονείου είναι παρόμοια με αυτή του δέρματος ενώ ταυτόχρονα περιέχει αυξητικούς παράγοντες που ευνοούν την επούλωση δερματικών πληγών. Η ιστολογική ανάλυση και οι βιοχημικές διαδικασίες της εν λόγο μελέτης έδειξαν πως τα βιοενεργά μόρια διατηρούνται στο ικρίωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη διασυνδεδεμένη πορώδη δομή. Ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα του, η οποία ήταν μη τοξική ενώ ελέγχθηκαν και οι μηχανικές του ιδιότητες, οι

οποίες κρίθηκαν κατάλληλες για το εν λόγο εγχείρημα. Μάλιστα, οι ανθρώπινοι ινοβλάστες προσδέθηκαν, επιβίωσαν, διείσδυσαν και πολλαπλασιάστηκαν με ευκολία αποκυτταροποιημένο Н χαρακτηριστική στο ικρίωμα. αποτελεσματικότητα του τελευταίου αξιολογήθηκε και με την διενέργεια in vivo πειράματος σε ποντίκι εργαστηρίου, κατά το οποίο παρατηρήθηκε πλήρης επούλωση του τραύματος, επαναεπιθηλίωση και νεοεμφανιζόμενα επιδερμικά στρώματα. Όλα αυτά δείχνουν πως τα αποκυτταροποιημένα ικριώματα βαρτονείου γέλης ευνοούν την ανάπτυξη ινοβλαστικών κυττάρων και επιταχύνουν τις διαδικασίες επούλωσης, κάτι που γεννά πολλές ελπίδες πως είναι ικανά στο άμεσο μέλλον να προσφέρουν κατάλληλα μοσχεύματα δέρματος (Beiki, Zeynali, and Seyedjafari 2017).

Οι αναγεννητικές θεραπείες για τραυματισμούς μεσοσπονδύλιου δίσκου αποτελούν σημαντική πρόκληση που αντιμετωπίζεται από την επιστημονική κοινότητα με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η χρήση εξωκυττάριας μήτρας, που προέρχεται από αποκυτταροποιημένους μη αυτόλογους ιστούς, και η οποία έχει χαρακτηριστεί ως βιοϋλικό με αξιοσημείωτη αναγεννητική ικανότητα, διότι οι δυνατότητες της ως θεραπευτικός παράγοντας αυξάνονται. Στο πλαίσιο αυτό μελέτη έδειξε πως n χρήση αποκυτταροποιημένου ικριώματος βαρτονείου γέλης από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο είναι ιδανική για την καλλιέργεια κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ειδικότερα, οι τεχνικές αποκυτταροποίησης καθώς και οι βιοχημικές αναλύσεις που ακολουθήθηκαν στον εν λόγο ιστό έδειξαν πως είναι σε θέση να παράγει μεγάλα τρισδιάστατα συσσωματώματα κυττάρων όταν σε αυτό τοποθετήθηκαν μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα βαρτονείου και ανθρώπινα κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Το ικρίωμα προκάλεσε τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ στα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου προήγαγε την διαφοροποίηση τους προς έναν δισκογονικό φαινότυπο. Έτσι για πρώτη φόρα αποδείχθηκε πως βελτιώνει τον εκφυλισμένο φαινότυπο των εν λόγο κυττάρων, δείχνοντας πως απλός η παρουσία της εξωκυττάριας μήτρας της βαρτονείου διατήρησε την βιωσιμότητα των κυττάρων και επηρέασε θετικά την έκφραση κρίσιμων ρυθμιστών της ομοιόστασης του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί θεραπείες για τον εκφυλισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου ικανές να αποκαταστήσουν την δομή και την λειτουργία του. Ωστόσο, η δυνατότητα του εν λόγο ικριώματος να επαναφέρει

τα εκφυλισμένα μεσοσπονδύλια κύτταρα, προδιαθέτουν την επιστημονική κοινότητα να ατενίζει το μέλλον με αισιοδοξία για την αξιοποίηση του ως ενδοδισκική βάση εξωκυττάριας μήτρας με ενέσιμη θεραπεία (Penolazzi et al. 2020).

Ακόμη, το αποκυτταροποιημένο ικρίωμα βαρτονείου γέλης έχει αποδειχθεί πως ευνοεί την ex vivo τρισδιάστατη καλλιέργεια αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων. Η διαπίστωση αυτή έγινε με καλλιέργεια στο ικρίωμα αυτό κυττάρων CD341 ομφαλικού αίματος με μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από μυελό των οστών και παρατηρήθηκε πως επεκτείνει σημαντικά το υποσύνολο ομφαλικών αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων, διατηρώντας την βιωσιμότητα και την δυναμικότητα διαφοροποίησης τους. Έτσι, η εξαγωγή συμπερασμάτων για την αλληλεπίδραση του εν λόγο ικριώματος με μεσεγχυματικά μυελού των οστών για την υποστήριξη της ex vivo καλλιέργειας ανθρώπινων ομφαλικών CD341 κυττάρων, δημιουργεί βάσιμες ελπίδες για μελλοντική χρήση στην κλινική μεταμόσχευση (Li et al. 2019).

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν κύρια αιτία θνησιμότητας του ανθρώπου. Τα αγγειακά ιστομηχανικά μοσχεύματα που ενσωματώνουν κύτταρα σε ένα βιοαποικοδομήσιμο ικρίωμα εμφανίζονται ως μια πολλά υποσχόμενη λύση για τους ασθενείς που δεν έχουν το κατάλληλο αυτόλογο μόσχευμα. Ένα από αυτά το οποίο βρίσκεται σε περίοπτη θέση σε εφαρμογές τέτοιου είδους είναι η βαρτόνειος γέλη, η οποία διαθέτει άφθονα βιολογικά μόρια όπως VEGF, FGF-2, TGF-b1, ενδοθηλίνη-1, κλπ., τα οποία φέρουν εις πέρας σημαντικές λειτουργίες στην αγγειακή λειτουργία. Η εξωκυττάρια μήτρα αυτού του ιστού έχει δείξει μεγάλη ικανότητα πρόσδεσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε αυτή ιδιαίτερα των μεσεγχυματικών αλλά και των ενδοθηλιακών. Γι' αυτό το λόγο είναι ικανή να διευκολύνει την διαφοροποίηση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων σε κύτταρα που μοιάζουν με ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζοντας ειδικούς δείκτες των κυττάρων αυτών. Σε όλα αυτά συγκαταλέγεται και η ιδιότητα αυτής να συγκρατεί με μεγαλύτερη ευκολία σε σχέση με άλλα ικριώματα ενδοθηλιακά κύτταρα παρά τις υψηλές διατμητικές πιέσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην έκφραση ιντεγκρινών a2 και b1, που σε συνδιασμό με όλα τα παραπάνω καθιστούν τον ιστό της βαρτονείου ως κατάλληλο βιοϋλικό κατασκευής ικριωμάτων για αγγειακή χρήση σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Dan et al. 2017).
Οι κλινικές εφαρμογές των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων βαρτονείου γέλης μπορούν να αποδοθούν σε πέντε σημαντικές βιολογικές ιδιότητες τους:

- εγκατάσταση αυτών σε φλεγμονώδης περιοχές μετά από τραυματισμό ιστού,
- έκκριση πολλαπλών βιοδραστικών μορίων, που είναι ικανή να διεγείρει
 την ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων και να αναστείλει την φλεγμονή,
- ικανότητας διαμόρφωσης των ανοσολογικών λειτουργιών,
- ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους τύπους κυττάρων,
- χρήση τους ως εργαλείο γονιδιακής θεραπείας (Kamal and Kassem 2020).

Αντιλαμβανόμενοι τα παραπάνω η επιστημονική κοινότητα θεώρησε πως τα εν λόγο κύτταρα από τον ιστό της βαρτονείου μπορούν να αποτελέσουν πολύ σημαντική πηγή κυττάρων για μελέτες αναγεννητικής ιατρικής. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει πως αυξάνουν τις ρυθμίσεις πολλών παραγόντων βοηθώντας στην επούλωση πληγών, όπως αύξηση της επέκτασης ινοβλαστών του ανθρώπινου δέρματος και μετανάστευση in vivo. Μάλιστα, θεωρούνται πιθανό χρήσιμο εργαλείο για την εφαρμογή κυτταρικών θεραπειών κυρίως για την βελτίωση ασθενειών, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, σακχαρώδης διαβήτης 2, τύπου 1 και πολλαπλή σκλήρυνση ωνз λόγω ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων που διαθέτουν μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία της ασθένειας μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Basiri et al. 2019; Pelosi, Castelli, and Testa 2012; Vieira Paladino et al. 2019). Επίσης, Με σκοπό την αυτόλογη χρήση των κύτταρων αυτών υπάρχουν τράπεζες διατήρησης τους μέσω συγκεκριμένων εργαστηριακών πρωτοκόλλων σε υγρό άζωτο. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει πως μια συνμεταμόσχευση μιας ενιαίας μονάδας αίματος ομφάλιου λώρου με μια μονάδα κυττάρων βαρτονείου γέλης από συγγενή ή μη συγγενή δότη αυξάνει την αποτελεσματικότητα εμφύτευσης της έγχυσης αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων ομφαλικού αίματος, αν και ο μηχανισμός δράσης είναι προς το παρόν αδιευκρίνιστος. Αν και ακόμη δεν υπάρχουν σαφή κλινικά αποτελέσματα παρά μόνο προκλινικά σε ζώα εργαστηρίου γίνεται περεταίρω διερεύνηση καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως μπορούν να εφαρμοστούν κυτταρικές θεραπείες για αιμοποιητική ανασύσταση,

55

την νόσο του Πάρκινσον, του διαβήτη, τον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας και τραυματισμών του νωτιαίου μυελού (Taghizadeh et al. 2011).



UC-MSC Clinical Trials (2009 - 2017) by Broad Indication

Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί μελέτες για πιθανή χρήση των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων της βαρτονείου ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων σε καρκίνους αλλά και για καρκινική θεραπεία χρησιμοποιώντας γνήσια (χωρίς να υφίστανται εργαστηριακή επεξεργασία) κύτταρα βαρτονείου, τα οποία έχουν εσωτερική αντινεοπλασματική επίδραση. Ουσιαστικά το όλο εγχείρημα στηρίζεται στην ικανότητα αυτών να δρούν ως οχήματα φαρμάκων για την θεραπεία καρκίνων, την προσέλκυση αυτών από παράγοντες που εκκρίνουν οι όγκοι καθώς και την ικανότητα αποτελεσματικής μεταφοράς γονιδίων για στοχευμένες καρκινικές θεραπείες. Ειδικότερα, τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται για να εκκρίνουν αντινεοπλασματικές πρωτεΐνες, όπως ιντερφερόνη-β, διότι διαθέτουν το γονίδιο έκφρασης και έκκρισης IFN-B. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ευνοϊκά θεραπευτικά αποτελέσματα σε τρωκτικά μοντέλα, αφού διαθέτουν την ικανότητα να προσδένονται επιλεκτικά σε όγκους. Η παραπάνω μελέτη έδειξε σημαντική μείωση στην περίπτωση καρκίνου του στήθους με μετάσταση στον πνεύμονα. Άλλη μελέτη σε ζώα εργαστηρίου έδειξε πως ο συνδιασμός (με συστηματική χορήγηση) γονιδιακής θεραπείας με κύτταρα βαρτονείου, που εκφράζουν την IFN-B και 5φθοροουρακίλη (μικρής ποσότητας), εμφανίζει σπουδαία μείωση στην ζωτικότητα των καρκινικών κυττάρων καθώς πιθανολογείται πως οι δύο θεραπείες μαζί ενδυναμώνουν η μία την άλλη. Επίσης, ανθρώπινα κύτταρα βαρτονείου γέλης που δεν έχουν επεξεργαστεί εργαστηριακά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μια ασφαλή στοχευμένη αντικαρκινική κυτταροθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού καθώς αυτά είναι ικανά να <<εξασθενήσουν>> την καρκινική κυτταρική σειρά MDA 231 του καρκίνου του μαστού. Αυτό παρατηρήθηκε πως συμβαίνει είτε μέσω φωσφοριλίωσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας AKT και ERK στα κύτταρα διεγείροντας έτσι τις ενδογενής οδούς απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, είτε εξασθενίζοντας την σύνθεση DNA αναστέλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων MDA 231 και κατά συνέπεια τον όγκου του καρκίνου του μαστού (Rachakatla and Troyer 2009).

Άλλες έρευνες που διεξήχθησαν σε τρωκτικά ζώα εργαστηρίου χρησιμοποιώντας τα εν λόγο κύτταρα έδειξαν επιδιόρθωση της βλάβης στον φωτοϋποδοχέα στην ασθένεια του αμφιβληστροειδή αλλά και ευεργετικά αποτελέσματα σε ποντίκι με αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (Rachakatla and Troyer 2009).

Επιπροσθέτως, ελπιδοφόρα κρίνονται τα δεδομένα για την χρήση των εν λόγο κυττάρων σε θεραπευτικό μηχανισμό ενάντια στον διαβήτη. Σε ζώα εργαστηρίου, με διαβήτη τύπου 2 χορηγήθηκαν ενέσιμα και παρατηρήθηκε πως μεγάλος αριθμός αυτών στις παγκρεατικές νησίδες, εγκαταστάθηκε αποδεικνύοντας πως η εγκατάσταση τους σχετίζεται στενά με τις ιστικές βλάβες. Άλλες μελέτες έδειξαν την ικανότητα τόσο διαφοροποιημένων όσο και αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων βαρτονείου να ρυθμίζουν την υπεργλυκαιμία σε διαβητικά ζώα εργαστηρίου. Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε διαβητικά ζώα εργαστηρίου παρατηρήθηκε να διαφοροποιούνται σε κύτταρα παραγωγής ινσουλίνης in vivo, ενώ σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε αναγέννηση των β-κυττάρων κάτι που αποδεικνύει την θεραπευτική δυναμική των εν λόγο κυττάρων. Επίσης, έχουν εφαρμογή σε γονιδιακές θεραπείες. Ειδικότερα, γενετικά τροποποιημένα κύτταρα βαρτονείου για να εκφράζουν ακρίνη εγχύθηκαν σε τρωκτικά ζώα εργαστηρίου με διαβήτη τύπου 2 με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση ευαισθησίας της ινσουλίνης και την αύξηση των επιπέδων του C-πεπτιδίου του πλάσματος. Μάλιστα, ο ενδογενής

57

πολλαπλασιασμός των παγκρεατικών β-κυττάρων αυξήθηκε περισσότερο από 9 φορές. Στα παραπάνω δεδομένα έρχεται να προστεθούν τα αποτελέσματα



μιας κλινικής μελέτης που διεξήχθη σε 15 διαβητικούς ασθενείς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μεσεγχυματικά κύτταρα βαρτονείου γέλης. Τρείς από αυτούς θεραπεύτηκαν και οι οκτώ από τους υπόλοιπους δώδεκα μείωσαν τις ημερήσιες ανάγκες τους σε ινσουλίνη σε ποσοστό περισσότερο του 50% σε σχέση με την αρχή. Μάλιστα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 οι οποίοι έπασχαν από την ασθένεια εδώ και 4 έως 8 χρόνια οι μελέτες έδειξαν πως η εν λόγο θεραπεία βελτίωσε τον μεταβολικό έλεγχο και την λειτουργία των β-κυττάρων. Έτσι, αποδείχθηκε πως τα κύτταρα αυτά είναι ασφαλή και αποτελεσματικά για θεραπευτική χρήση ενάντια στον διαβήτη τύπου 1 και 2 αλλά και σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί πρόσφατα ή σχετικά μακροχρόνια με την νόσο. Επιπλέον, μελέτες σε αρχικό στάδιο διεξάγονται και για την παρασκευή φαρμακευτικού σκευάσματος για διαβητικούς από κύτταρα βαρτονείου γέλης (Kamal and Kassem 2020).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>

Η εκπόνηση της εν λόγο ερευνητικής πτυχιακής εργασίας έχει ως βασικό αντικείμενο μελέτης τον ιστό βαρτονείου γέλης, που απομονώνεται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, ακολουθώντας πρωτόκολλα συγκεκριμένης μεθοδολογίας με απώτερο σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων. Κύριος στόχος είναι η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης της βαρτονείου γέλης με σκοπό την χρησιμοποίηση της ως βιοϋλικό, με βάση τις αρχές της ιστομηχανικής, στην αναγεννητική ιατρική. Ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα στάδια ενώ τέλος έγινε προσπάθεια ανάλυσης των δεδομένων με βάση αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας.

διεξήχθη κάτω από Η μελέτη βασικά στάδια στα οποία συμπεριλαμβάνεται προετοιμασία ιστών βαρτονείου n γέλης, n αποκυτταροποίηση τους μέσω τριών σταδίων, ιστολογικός έλεγχος και ποσοτικοποιήσεις των δομικών στοιχείων και του υπάρχοντος γενετικού υλικού των ιστών. Η απομόνωση τους γινόταν με συγκεκριμένη τεχνική από ένα μικρό φυσιολογικού ανθρώπινου Н κομμάτι ομφάλιου λώρου. μελέτη πραγματοποιήθηκε και σε φυσιολογικά αλλά και σε αποκυτταροποιημένα δείνματα βαρτονείου γέλης. Η αποκυτταροποίηση έγινε με την βοήθεια τριών διαλυμάτων αποκυτταροποίησης κατά σειρά του CHAPS, του SDS και του a-MEM + 40% FBS. Με την βοήθεια του ιστολογικού ελέγχου καθώς και των ιστολογικών χρώσεων αιματοξυλίνης-εωσίνης, τολοουιδίνης, Alcian Blue, Sirious Red και ορσεΐνης πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των δειγμάτων για την επιτυχή ή όχι αποκυτταροποίηση τους καθώς και η σύγκριση μεταξύ αποκυτταροποιημένων ή μη αποκυτταροποιημένων δειγμάτων. Επίσης, παρατηρήθηκαν και πολλά άλλα σημαντικά συστατικά και χαρακτηριστικά τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην χρήση της βαρτονείου γέλης ως βιοϋλικό στην αναγεννητική ιατρική. Τελευταία έγιναν τα πειράματα των ποσοτικοποιήσεων πάλι σε αποκυτταροποιημένα και μη αποκυτταροποιημένα δείγματα μέσω συγκεκριμένων πρωτοκόλλων και διαδικασιών που θα αναλυθούν παρακάτω.

1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

<u>1.1) Γενικά διαλύματα</u>

Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν κάποια από τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους καθώς δεν ήταν όλα έτοιμα από το εμπόριο ή δεν ήταν στις συγκεντρώσεις που απαιτούνταν από τα πρωτόκολλα των πειραμάτων.

<u>1.1.1) Διάλυμα PBS 1x</u>

Εξοπλισμός- διαλύματα:

- Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 ml (VITLAB).
- Φίλτρο διήθησης 0.22 μm (CORNING).
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- PBS 10x 500 ml (GIBCO).
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.

Η παρασκευή του διαλύματος PBS 1x πραγματοποιείται με την προσθήκη 50 ml PBS 10x σε 450 ml απεσταγμένο νερό στήλης B. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα σε ογκομετρικό κύλινδρο 1000 ml ο οποίος πωματίστηκε με parafilm και ανακινήθηκε για την ανάμιξη του διαλύματος. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε το διάλυμα σε φίλτρο διήθησης 0,22 μm (CORNING). Το διάλυμα PBS 1x που προκύπτει παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για μέγιστο χρονικό διάστημα, από την ημέρα παρασκευής του, τις 14 ημέρες.

Το PBS 10x 500 ml (GIBCO) που χρησιμοποιείται αποτελεί αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,2 και περιέχει μονοβασικό φωσφορικό κάλιο, χλωριούχο νάτριο και διβασικό φωσφορικό νάτριο.



<u>1.1.2) a-MEM(GIBCO)</u>

Το διάλυμα a-MEM(GIBCO) περιέχει τα ελάχιστα απαραίτητα μέσα για την καλλιέργεια κυττάρων. Συγκεκριμένα, το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα περιείχε ηλεκτρολύτες Na⁺ και K⁺, δεσοξυριβονουκλεοτίδια και ριβονουκλεοτίδια ενώ επίσης για τον έλεγχο της ποιότητας αυτού περιέχεται και ο δείκτης phenol red. Εάν το διάλυμα δεν έχει επηρεαστεί και είναι κατάλληλο για χρήση έχει ως φυσιολογικό χρώμα το κόκκινο λόγω του δείκτη. Εάν όμως έχει οξειδωθεί τότε το χρώμα του γίνεται μωβ. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4° C και το μέγιστο χρονικό διάστημα χρήσης του, έπειτα από το άνοιγμα, είναι 14 ημέρες.



1.1.3) Penicillin-streptomycin (GIBCO)

Η στρεπτομυκίνη εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων ενώ η πενικιλίνη καταστρέφει το τοίχωμα των βακτηρίων. Σε όποιο διάλυμα πραγματοποιήθηκε χρήση αυτών έγινε προσθήκη μικρού όγκου με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10.000 U/ml και η αποθήκευση του γίνεται στους -5 έως -20° C.



1.1.4) Διάλυμα FBS (G

Το διάλυμα FBS (Fetal Bovine Serum), δηλαδή ορός εμβρύου βοοειδών, χρησιμοποιείται για ευρύ φάσμα τύπων κυττάρων και ιδιαίτερα για ευαίσθητες κυτταρικές σειρές. Εκτός των άλλων περιέχει DNA-ασες και RNA-ασες και στα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του γενετικού υλικού. Φυλάσσεται στους -5 έως -20° C.



1.2) Παρασκευή διαλυμάτων αποκυτταροποίησης

<u>1.2.1) Διάλυμα CHAPS</u>

<u>Εξοπλισμός-διαλύματα:</u>

- Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 ml (VITLAB).
- Φίλτρο αποστείρωσης 0,45 μm (SARSTEDT).
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).

- Συσκευή μέτρησης pH (HANNA).
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.
- CHAPS (SIGMA).
- NaCl (SIGMA).
- EDTA (USB CORPORATION).
- Διάλυμα PBS 1x.

Το διάλυμα CHAPS παρασκευάζεται από PBS 1x, 8 mM CHAPS, 1M NaCl, 25 mM EDTA pH 7,5. Για την παρασκευή του υπολογίστηκαν και ζυγίστηκαν με την χρήση του ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας 0,983 gr CHAPS, 11,7 gr NaCl, 2 gr EDTA, τα οποία προστέθηκα σε 200 ml PBS 1x. Ακολούθησε μέτρηση του pH του εν λόγο διαλύματος και ρύθμιση του σε pH 7,5. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε σε φίλτρο αποστείρωσης 0,45 μm και είναι έτοιμο προς χρήση. Όλη η διαδικασία έγινε εντός του θαλάμου νηματικής ροής κλάσης ΙΙ ενώ για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρική πιπέτα. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για μέγιστο χρονικό διάστημα, από την στιγμή παρασκευής του, τις 14 ημέρες.



Το CHAPS είναι κατιονικό απορρυπαντικό με μεγαλύτερη τάση μετουσίωσης πρωτεϊνών σε σύγκριση με άλλα απορρυπαντικά της εν λόγο κατηγορίας. Δεν επηρεάζει το κολλαγόνο του ιστού, ούτε απομακρύνει το γενετικό υλικό αλλά απομακρύνει τα κύτταρα του ιστού.

<u>1.2.2) Διάλυμα SDS</u>

Εξοπλισμός-διαλύματα:

- Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 ml (VITLAB).
- Φίλτρο αποστείρωσης 0,45 μm (SARSTEDT).
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Συσκευή μέτρησης pH (HANNA).
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.
- SDS (SIGMA).
- NaCl (SIGMA).
- EDTA (USB CORPORATION).
- Διάλυμα PBS 1x.

Το διάλυμα SDS παρασκευάζεται από PBS 1x, 1,8 mM SDS, 1M NaCl, 25 mM EDTA pH 7,5. Για την παρασκευή του υπολογίστηκαν και ζυγίστηκαν με την χρήση του ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας 0,112 gr SDS, 11,7 gr NaCl, 2 gr EDTA, τα οποία προστέθηκα σε 200 ml PBS 1x. Ακολούθησε μέτρηση του pH του εν λόγο διαλύματος και ρύθμιση του σε pH 7,5. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε σε φίλτρο αποστείρωσης 0,45 μm και είναι έτοιμο προς χρήση. Όλη η διαδικασία έγινε εντός του θαλάμου νηματικής ροής κλάσης ΙΙ ενώ για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρική πιπέτα. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για μέγιστο χρονικό διάστημα, από την στιγμή παρασκευής του, τις 14 ημέρες.



Το SDS ανήκει στην κατηγορία των ιονικών απορρυπαντικών. Είναι αποτελεσματικό στην αφαίρεση κυτταρικών συστατικών από τον ιστό ακόμη και υπολειμμάτων αυτών. Ειδικότερα διαλυτοποιεί κυτταροπλασματικές και πυρηνικές μεμβράνες και μετουσιώνει πρωτεΐνες ενώ κρίνεται πιο αποτελεσματικό σε σύγκριση με άλλα για την αφαίρεση πυρηνικών υπολειμμάτων και κυτταροπλασματικών πρωτεΐνών. Ωστόσο, τείνει να διασπά την φυσική δομή του ιστού προκαλώντας μείωση της συγκέντρωσης γλυκοζαμινογλυκανών και απώλεια της ακεραιότητας του κολλαγόνου αλλά δεν το απομακρύνει από τον ιστό.

<u>1.2.3) Διάλυμα a-MEM με FBS 40% v/v</u>

Εξοπλισμός-διαλύματα:

- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- α-MEM 500 ml (GIBCO).
- FBS (GIBCO).
- Penicillin-streptomycin U/ml (GIBCO).

Για την παρασκευή 20 ml του εν λόγο διαλύματος απαιτούνται 8 ml FBS σε 12 ml a-MEM και 1 ml Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml) για την αποφυγή

επιμολύνσεων. Το διάλυμα φυλάγεται στους 4° C για μέγιστο χρονικό διάστημα, από την ημέρα παρασκευής του, τις 14 ημέρες.

<u>1.2.4) Λοιπά διαλύματα</u>

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και κάποια πολύ κοινά διαλύματα στα πρωτόκολλα χρώσεων και συγκεκριμένα διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR CHEMICALS), ξυλόλης (VWR CHEMICALS) και φορμόλης (VWR CHEMICALS). Επιπλέον, για την τοποθέτηση καλυπτρίδας χρησιμοποιήθηκε κόλλα Coverquick (VWR CHEMICALS) σε κάποιες χρώσεις ενώ σε κάποιες άλλες DPX.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1) Ιστολογικός έλεγχος δειγμάτων

2.1.1) Μονιμοποίηση δειγμάτων

<u>Εξοπλισμός-διαλύματα:</u>

- Ποτήρι ζέσεως 150 ml (KIMAX).
- Λαβίδα εργαστηρίου.
- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης.
- Διάλυμα φορμόλης 10% v/v (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 70%.
- Διάλυμα PBS 1x.

Έκπλυση των δειγμάτων Βαρτονείου γέλης με PBS 1x και τοποθέτηση τους σε πλαστικές κασετίνες έγκλεισης εντός διαλύματος αλκοόλης 70 %. Η μονιμοποίηση των δειγμάτων επιτυγχάνεται έπειτα από την προσθήκη φορμόλης στο ποτήρι ζέσεως, στο οποίο έχουν τοποθετηθεί οι κασετίνες με Βαρτόνειο γέλη, έως ότου καλυφθούν αυτά. Τα δείγματα παραμένουν στην φορμόλη από 4 έως 24 ώρες ανάλογα με το μέγεθος του υλικού. Τα δείγματα Βαρτονείου γέλης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρού μεγέθους από 0,5 έως το πολύ 4 εκατοστά. Παρόλο αυτά παραμέναν στην φορμόλη για σχεδόν μια ημέρα (περίπου 16 ώρες). Την επόμενη ημέρα τοποθετούνται σε διάλυμα αλκοόλης 70% και μεταφέρονται στην ιστοκινέτα.

2.1.2) Αυτοματοποιημένη ιστολογική τεχνική

Εξοπλισμός-διαλύματα:

• Ιστοκινέτα (LEICA TP 1020).

Η αυτοματοποιημένη ιστολογική τεχνική πραγματοποιήθηκε στην ιστοκινέτα του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. Οι κασετίνες των δειγμάτων τοποθετήθηκαν εντός της ιστοκινέτας και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Στάδιο αφυδάτωσης: Το στάδιο αυτό αποτελείται από ανιούσα σειρά αλκοολών με σκοπό την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αφυδάτωση του ιστού, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη μικροσκόπηση. Συγκεκριμένα, τα δείγματα Βαρτονείου γέλης διέρχονται από διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95% και 100% για 1 ώρα στο καθένα.
- Στάδιο διαφανοποίησης: Ακολουθεί λοιπόν το εν λόγο στάδιο κατά το οποίο τα δείγματα Βαρτονείου γέλης εισάγονται σε δύο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης για 1 ώρα στο καθένα. Με αυτό το στάδιο στην ουσία επιδιώκουμε μια πιο ευκρινή εικόνα του ιστού για την ευκολότερη και καλύτερη μικροσκόπηση του. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ξυλόλης η οποία απομακρύνει τα υπολείμματα αλκοόλης.
- Στάδιο εμποτισμού σε παραφίνη: Τα δείγματα εισάγονται σε δύο διαδοχικά διαλύματα καθαρής παραφίνης για 1 ώρα στο καθένα. Η παραφίνη σε αυτό το στάδιο είναι υγρή καθώς η θερμοκρασία είναι υψηλή 60° C και διατηρεί την δομή των αφυδατωμένου ιστών για να μην συρρικνωθούν.

<u>Τελικό στάδιο</u>: Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται έκπλυση με αλκοόλη 100° και απεσταγμένο νερό.

Στην συνέχεια γίνεται η έγκλειση των δειγμάτων εντός παραφίνης, μια διαδικασία που στο παθολογοανατομικό εργαστήριο καλείται σκήνωμα, σε ειδικό μηχάνημα και προκύπτουν τα λεγόμενα block παραφίνης. Το block αποτελείται στην ουσία από την πλαστική κασέτα και την παραφίνη, η οποία σε θερμοκρασία δωματίου στερεοποιείται και εντός αυτής είναι το δείγμα μας που στην προκειμένη περίπτωση είναι η Βαρτόνειος γέλη.

<u>2.1.3) Μικροτόμιση δειγμάτων</u>

Εξοπλισμός-διαλύματα:

- Μικροτόμος (LEICA RM 2265).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (Thermo scientific).
- Υδατόλουτρο (Thermo scientific).

Η μικροτόμιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. Οι τομές δειγμάτων που λήφθηκαν έχουν πάχος 10 μm. Αναλυτικότερα, τοποθετείται το block παραφίνης στον μικροτόμο και γίνεται το λεγόμενο <<τριμάρισμα>> έως ότου αποκαλυφθεί ο ιστός, ώστε να ληφθούν τομές που θα περιέχουν ολόκληρο το κομμάτι αυτού. Αφού γίνει αυτό οι τομές μεταφέρονται με προσοχή στο υδατόλουτρο 60° C, ώστε να ανοίξουν καλά οι τομές παραφίνης και να τοποθετηθούν πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες.

2.1.4) Προετοιμασία τομών για χρώσεις

Εξοπλισμός-διαλύματα:

- Διάλυμα ξυλόλης (VWR CHEMICALS).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR CHEMICALS).
- Διαλύματα αλκοολών 50%, 70%, 80%, 95%.
- Πλαστικά δοχεία.
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (Thermo scientific).

Πριν την διεξαγωγή της εκάστοτε ιστολογικής χρώσης των παρασκευασμάτων απαιτείται το στάδιο της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης των τομών ενώ προηγείται η τοποθέτηση αυτών σε θερμαντική πλάκα για 10 λεπτά στους 60° C, ώστε να λιώσει η παραφίνη και να μην απομακρυνθεί και ο ιστός μαζί της στην ξυλόλη. Η εν λόγο διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:

- Στάδιο αποπαραφίνωσης: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που έχουν πάνω τις τομές εισάγονται σε διάλυμα ξυλόλης για 5 λεπτά. Έτσι, απομακρύνεται η παραφίνη και μένει ο ιστός πάνω στην πλάκα.
- <u>Στάδιο ενυδάτωσης</u>: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εισάγονται σε διαδοχικά διαλύματα αλκοολών 100% για 5 λεπτά, 96% για 2 λεπτά, 80% για 2 λεπτά, 50% για 2 λεπτά.
- Στάδιο προσθήκης εκάστοτε χρώσης: Σε αυτό το στάδιο οι αντικειμενοφόρες πλάκες εισάγονται στο διάλυμα της εκάστοτε χρώσης για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα που απαιτείται. Ακολουθεί η έκπλυση σε τρεχούμενο νερό βρύσης ώστε να ακολουθήσει αμέσως το στάδιο της αφυδάτωσης.

Για την ολοκλήρωση των παρασκευασμάτων απαιτείται το στάδιο αφυδάτωσης αλλά και αυτό της τοποθέτησης καλυπτρίδας στις αντικειμενοφόρες πλάκες τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω αναλυτικά σε κάθε χρώση.

2.2) Μικροσκόπηση και επεξεργασία εικόνων

<u>2.2.1) Μικροσκόπηση δειγμάτων</u>

<u>Εξοπλισμός:</u>

• Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (LEICA DM LS2).

Για την μικροσκόπηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο LEICA DM LS2 και έγινε παρατήρηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ανάλογα την χρώση.

2.2.2) Επεξεργασία εικόνων

Εξοπλισμός:

- Πρόγραμμα λήψης και επεξεργασίας εικόνων IC CAPTURE 2.2
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων image J.
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων Image-Pro plus.

Η λήψη και η επεξεργασία των εικόνων έγινε με την χρήση των προγραμμάτων IC CAPTURE 2.2 και του προγράμματος image J. Η χρήση αυτών αποσκοπούσε στην λήψη εικόνας για τα χαρακτηριστικά που ερευνούνται καθώς και τα πολύτιμα προγράμματα τους μέσω των οποίων αξιολογούνται πολύ βασικά χαρακτηριστικά του ιστού που βοήθησαν στην συναγωγή συμπερασμάτων.

<u>2.3) Στατιστική ανάλυση</u>

Εξοπλισμός:

• Στατιστικό πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων Microsoft Excel 2007.

Η χρήση του προγράμματος Microsoft Excel 2007 ήταν θεμελιώδους σημασίας για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προκύψαν. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης ενώ η αξιολόγηση της σημαντικότητας των τιμών καθορίστηκε με το Student's t-test για ίση διακύμανση δύο δειγμάτων. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με p<0,05.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

<u>3.1) Απομόνωση Βαρτονείου γέλης</u>

<u>Εξοπλισμός-διαλύματα:</u>

- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία.
- Λαβίδα εργαστηρίου.

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 50 ml.
- Πιάτο Petri 150 mm.
- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.
- Διάλυμα PBS 1x.
- Μηχάνημα αποστείρωσης εργαλείων (HYDRA ELECTRONIC).
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Απιονισμένο νερό στήλης Β.

Οι ιστοί Βαρτονείου γέλης που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο υγειών ατόμων έπειτα από πλήρη συγκατάθεση τους. Η φύλαξη των ομφάλιων λώρων έγινε σε συνθήκες 4° C αμέσως μετά τον τοκετό, ενώ το συνολικό χρονικό διάστημα από τον τοκετό μέχρι την απομόνωση της Βαρτονείου γέλης δεν ξεπέρασε τις 24 ώρες. Αναλυτικά, η διαδικασία έχει ως εξής:

- Αποστείρωση των εργαλείων σε μηχάνημα αποστείρωσης (HYDRA ELECTRONIC), στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό στήλης Β και τα εργαλεία έχουν τοποθετηθεί σε ειδική κασετίνα εργαλείων με φίλτρο.
- Η διαδικασία απομόνωσης λαμβάνει χώρα καθόλη την διάρκεια σε θάλαμο νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Σε σωλήνα προπυλενίου 50 ml προσθέτουμε 2 ml PBS 1x για την έκπλυση του κομματιού ομφάλιου λώρου που έχει αποκοπεί με την βοήθεια χειρουργικού ψαλιδιού. Η έκπλυση πραγματοποιείται για την απομάκρυνση τυχών θρόμβων, πηγμάτων και υπολειμμάτων αίματος.
- Στην συνέχεια με την βοήθεια της λαβίδας εργαστηρίου παίρνουμε το κομμάτι του ομφαλίου από τον σωλήνα προπυλενίου και το τοποθετούμε στο πιάτο Petri.

Με προσοχή εντοπίζουμε τις δύο αρτηρίες και την μία φλέβα από το κομμάτι του ομφάλιου λώρου και αφού πιάσουμε με την λαβίδα την μια αρτηρία και την φλέβα μαζί, πιάνουμε με το χειρουργικό ψαλίδι την άλλη αρτηρία και τραβάμε με προσοχή προς αντίθετη κατεύθυνση. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός αυτών. Στην συνέχεια αφαιρούμε από το κομμάτι του ομφαλίου την αρτηρία και την φλέβα έτσι ώστε να μείνει μόνο η Βαρτόνειος γέλη η οποία βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά του ομφαλίου, ανάμεσα στα αγγεία του.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε φορώντας γάντια και ψεκάζοντας με αιθανόλη πριν και μετά τον θάλαμο νηματικής ροής ΙΙ ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση ενώ πριν την χρήση αυτού είχε γίνει αποστείρωση μέσω ακτινοβολίας UV.



3.2) Αποκυτταροποίηση Βαρτονείου γέλης

Εξοπλισμός-διαλύματα:

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Μηχάνημα περιστροφικής ανακίνησης (FINEPCR).
- Συσκευή θερμαινόμενης ανακίνησης (Heildoph Unimax 1010).
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία.
- Κρικοφόρο λαβίδα εργαστηρίου.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 15 ml.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 50 ml.
- Πιάτο Petri 150 mm.

- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.
- Διάλυμα PBS 1x.
- Διάλυμα CHAPS.
- Διάλυμα SDS.
- Διάλυμα α-ΜΕΜ με FBS 40% v/v.

Το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης Βαρτονείου γέλης που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Στα δείγματα που απομονώθηκαν και βρίσκονται σε πιάτο Petri πραγματοποιείται έκπλυση σε PBS 1x που υπάρχει μέσα σε σωλήνα πολυπροπυλενίου.
- Τοποθέτηση του κάθε δείγματος ιστού σε διαφορετική σωλήνα πολυπροπυλενίου με κρικοφόρο λαβίδα εργαστηρίου (για να μην τραυματιστεί ο ιστός).
- Σε κάθε σωλήνα που τοποθετείται το κάθε δείγμα έχει τοποθετηθεί με την βοήθεια της ηλεκτρικής πιπέτας 9 ml διαλύματος αποκυτταροποίησης CHAPS. Με το εν λόγο διάλυμα επιδιώκεται η απομάκρυνση των κυττάρων από τον ιστό.
- Τοποθέτηση των σωλήνων που περιέχουν το CHAPS και τον ιστό, οι οποίοι έχουν πωματιστεί και με πάραφιλμ, στο μηχάνημα περιστροφικής κίνησης για 22 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά το πέρας των 22 ωρών τα δείγματα τοποθετούνται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου, οι οποίοι περιλαμβάνουν 9 ml από το δεύτερο διάλυμα αποκυτταροποίησης που είναι το SDS, και στην συνέχεια τοποθετούνται με τον ίδιο τρόπο και την ίδια ταχύτητα στο μηχάνημα περιστροφικής κίνησης για 22 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Με το εν λόγο διάλυμα γίνεται απομάκρυνση των πλήρη και ατελών πυρήνων των κυττάρων και γενικότερα πιο αποτελεσματική απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων από τον ιστό.

- Μετά το πέρας των 22 ωρών τα δείγματα τοποθετούνται σε σωλήνες των 50 ml, στις οποίες έχουν προστεθεί 12 ml α-MEM και 8 ml FBS, δηλαδή στο τρίτο διάλυμα αποκυτταροποίησης. Με αυτό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του γενετικού υλικού των ιστών.
- Οι σωλήνες αυτοί, που έχουν πωματιστεί και με πάραφιλμ, τοποθετούνται στην συσκευή θερμαινόμενης ανακίνησης στους 37° C και υπό συνεχή ανακίνηση για 48 ώρες.

Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες και διαρκή ανακίνηση.

3.3) Μορφομετρικά χαρακτηριστικά Βαρτονείου γέλης

<u>Εξοπλισμός-Διαλύματα</u>

- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία.
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Διηθητικό χαρτί.
- Μιλιμετρέ χαρτί.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 50 ml.
- Πιάτο Petri 150 mm.
- Πιπέτα προπυλενίου 10 ml.
- Διάλυμα PBS 1x.
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων image J.
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων Image-Pro plus.

Τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του ιστού Βαρτονείου γέλης μετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν και στον φυσικό ιστό, δηλαδή σε εκείνον που δεν αποκυτταροποιήθηκε, αλλά και στον αποκυτταροποιημένο. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν 5 δείγματα Βαρτονείου γέλης τα οποία κόπηκαν στην μέση και έτσι 1 κομμάτι θεωρούνταν ο μη αποκυτταροποιημένος ιστός στον οποίο γινόταν οι μετρήσεις και το άλλο αποκυτταροποιούνταν, όπως αναλύθηκε, και λαμβάναν χώρα μετέπειτα οι μετρήσεις.

Τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα ήταν το μήκος, το πλάτος, η ολική επιφάνεια, το πάχος, το βάρος πριν και μετά την αποκυτταροποίηση καθώς επίσης και οι πόροι του ιστού πριν και μετά την αποκυτταροποίηση.

Μέτρηση βάρους:

Τα δείγματα που είχαν απομονωθεί και βρίσκονταν σε σωλήνα με PBS 1x τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί η παραπάνω υγρασία και να γίνει μια αντιπροσωπευτική μέτρηση του βάρους του ιστού. Η μέτρηση έγινε με την βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας τόσο στα μη αποκυτταροποιημένα όσο και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα του ιστού. Μάλιστα, στα αποκυτταροποιημένα έγινε μέτρηση πριν και μετά την αποκυτταροποίηση.

Μέτρηση μήκους, πλάτους, ολικής επιφάνειας και πάχους:

Η μέτρηση των εν λόγω μεγεθών πραγματοποιήθηκε στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και στα αποκυτταροποιημένα πριν και μετά την αποκυτταροποίηση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πιάτο Petri κάτω από το οποίο υπήρχε μιλιμετρέ χαρτί. Φωτογραφήθηκαν σε διάφορες θέσεις ώστε μέσω των προγραμμάτων επεξεργασίας εικόνων image J και image-Pro plus να υπολογισθούν τα απαιτούμενα μεγέθη.



Ενδεικτικές φωτογραφίες της διαδικασίας :





Μέτρηση πόρων:

Η μέτρηση των πόρων έγινε σε αποκυτταροποιημένα δείγματα πριν και μετά την αποκυτταροποίηση καθώς και στα μη αποκυτταροποιημένα. Η διαδικασία έγινε με την βοήθεια των προγραμμάτων image J και image-Pro plus στα οποία εισήχθησαν φωτογραφίες έπειτα από χρώση των παραπάνω δειγμάτων με αιματοξυλίνη- εωσίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1) ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ-ΧΡΩΣΕΙΣ

Ο έλεγχος και η αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης της Βαρτονείου γέλης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια των εξής ιστολογικών χρώσεων (Πίνακας 1):

ΧΡΩΣΗ	ΣΚΟΠΟΣ
Αιματοξυλίνη-εωσίνη	Βάφει πυρήνες-εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.
Toluidine Blue	Βάφει Γλυκοζαμινογλυκάνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.
Alcian Blue	Βάφει όξινους πολυσακχαρίτες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.
Sirius Red	Βάφει κολλαγόνο εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.
Orcein	Βάφει ελαστίνη εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Πίνακας 1: Λίστα χρώσεων

<u>Εξοπλισμός-διαλύματα:</u>

- Απαγωγός (PHARMACEUTICAL LAB FURNITURE).
- Πλαστικά δοχεία.
- Μεταλλική λαβίδα.
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (THERMO SCIENTIFIC).
- Καλυπτρίδες (lab box).
- Διάλυμα ξυλόλης (VWR CHEMICALS).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR CHEMICALS).
- Διαλύματα αλκοολών 50%, 80%, 96%.
- Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer (SIGMA).
- Διάλυμα Εωσίνης (SIGMA).
- Διάλυμα alcian blue (SIGMA).
- Διάλυμα toluidine blue (SIGMA).
- Νερό βρύσης.
- Διάλυμα κάλυψης DPX.

• Διάλυμα κάλυψης Coverquick.

Μια γενική περιγραφή του τρόπου εργασίας, με τον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα χρώσεων είναι η εξής:

- Παρασκευή των διαλυμάτων χρώσεων όσα δεν ήταν έτοιμα από το εμπόριο.
- Η εκτέλεση των πρωτοκόλλων ιστολογικών χρώσεων πραγματοποιούνταν πάντοτε μέσα στον απαγωγό, μέσα στον οποίο είχαν τοποθετηθεί πλαστικά δοχεία μικρού μεγέθους (200 ml) με καπάκια καθώς τα διαλύματα είναι πτητικά. Μέσα σε αυτά είχαν τοποθετηθεί τα διαλύματα ξυλόλης, αλκοόλης και χρώσεων με την κατάλληλη σειρά ώστε να εκτελεστεί το κάθε πρωτόκολλο σωστά.
- Για την παρασκευή των διαλυμάτων αλκοόλης, διαφορετικών συγκεντρώσεων, γίνονταν κάθε φορά η απαιτούμενη αραίωση με προσθήκη διαλύματος αλκοόλης 100% και του κατάλληλου όγκου απιονισμένου νερού σε ογκομετρικό κύλινδρο 1000 ml.
- Ο υπόλοιπος απαιτούμενος εξοπλισμός (καλυπτρίδες, διάλυμα κόλλας) ήταν τοποθετημένα στον απαγωγό και διαθέσιμα προς χρήση στο τέλος κάθε πρωτοκόλλου.
- Μετά την ολοκλήρωση του κάθε πρωτοκόλλου τα παρασκευάσματα αφήνονται στον απαγωγό για εύλογο χρονικό διάστημα ώστε να στεγνώσουν και να πραγματοποιηθεί η μικροσκοπική παρατήρηση.

Το πρωτόκολλο που ακολουθούνταν για την χρώση των παρασκευασμάτων ήταν στα κύρια μέρη του ίδιο και στις 5 χρώσεις με κάποιες μικρές τροποποιήσεις που απαιτούνταν για την καθεμία από αυτές. Το εν λόγο πρωτόκολλο λοιπόν συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) :

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο χρώσεων

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>
Τοποθέτηση των δειγμάτων στην	Λιώσιμο παραφίνης για
θερμαντική πλάκα για 10 λεπτά	αποτελεσματικότερη χρώση των
στους 60° C.	τομών του ιστού.
Τοποθέτηση σε διάλυμα ξυλόλης για	
6 λεπτά.	Διαύγαση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
100 % για 5 λεπτά.	Ενυδάτωση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
96 % για 2 λεπτά.	Ενυδάτωση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
80 % για 2 λεπτά.	Ενυδάτωση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
50 % για 2 λεπτά.	Ενυδάτωση.
Τοποθέτηση στην εκάστοτε χρώση	
για το προβλεπόμενο χρονικό	Χρώση των παρασκευασμάτων.
διάστημα.	
Εκπλυση των παρασκευασμάτων σε	Απομάκρυνση του διαλύματος
τρεχούμενο νερό βρύσης.	χρώσεως και των υπολειμμάτων
Τοποθέτηση σε διάλιμια αλκοόλης	αυτού.
	Δωμδάτωση
	ΑφυδάΙωδη.
Ιοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
100 % για 1 λεπτό.	Αφυδάτωση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα αλκοόλης	
100 % για 1 λεπτό.	Αφυδάτωση.
Τοποθέτηση σε διάλυμα ξυλόλης για	
1 λεπτό.	Διαύγαση.
Τοποθέτηση διαλύματος κόλλας στα	Τοποθέτηση και κόλληση της
παρασκευάσματα.	καλυπτρίδας.

4.1.2) Αιματοξυλίνη-Εωσίνη

Αφού έχει προηγηθεί με επιτυχία το στάδιο της προετοιμασίας των ιστολογικών δειγμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2, 2.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ) ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης Αιματοξυλίνης-Εωσίνης. Μεταξύ του σταδίου ενυδάτωσης και αφυδάτωσης παρεμβάλλεται αυτός της χρώσης. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer για 10-20 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί πολύ καλό πλύσιμο των τομών με τρεχούμενο νερό βρύσης, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να μην πέφτει με πίεση πάνω στην θέση του ιστού. Αμέσως μετά τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα εωσίνης για 1 λεπτό. Επαναλαμβάνεται το πλύσιμο με τρεχούμενο νερό και ακολουθεί το στάδιο αφυδάτωσης και τοποθέτησης και τοποθέτησης και τοποθέτησης και τοποθέτησης και τοποθέτησης και το τολογικά παρασκευάσματα.

- <u>Στάδιο αφυδάτωσης</u>: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών εισάγονται σε ανιούσα σειρά αλκοολών 80 % για 10 δευτερόλεπτα, 96% για 10 δευτερόλεπτα, 100% για 1 λεπτό, 100% για 1 λεπτό και ξυλόλη για 1 λεπτό.
- Στάδιο τοποθέτησης καλυπτρίδας: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το που αφαιρεθούν από την ξυλόλη τους τοποθετείται κόλλα DPX για να κολλήσει η καλυπτρίδα, ώστε να προκύψει ένα καλό παρασκεύασμα προς μικροσκόπηση.

Με την χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη επιτυγχάνεται ο χρωματισμός των πυρήνων των κυττάρων με μωβ χρώμα ενώ το κυτταρόπλασμα-εξωκυτταρική θεμέλια ουσία βάφεται με ροζ χρώμα. Με την βοήθεια αυτής της χρώσης επίσης αξιολογείται και η επιτυχία της αποκυτταροποιητικής διαδικασίας του ιστού. Στα αποκυτταροποιημένα δείγματα δεν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο πυρήνες πάρα μόνο η εξωκυτταρική θεμέλια ουσία με χρώμα μωβ ενώ στα μη αποκυτταροποιημένα παρατηρούνται κανονικά οι πυρήνες και η εξωκυτταρική θεμέλια ουσία με τα αντίστοιχα χρώματα.

4.1.3) Toluidine Blue

Παρασκευή χρώσης:

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Χρώση Toluidine Blue υπό μορφή σκόνης (SIGMA).
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 50 ml.
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.
- Αποστειρωμένο φίλτρο σύριγγας 0,45 μm (CORNING INCORPORATED).

Για την παρασκευή 50 ml χρώσεως Toluidine Blue προστέθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου 500 mg σκόνης της χρώσεως, τα οποία ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και 50 ml απεσταγμένου νερού στήλης B. Γίνεται καλή ανακίνηση και αφού περάσουν κάποια λεπτά γίνεται το φιλτράρισμα του διαλύματος της χρώσης, με την βοήθεια αποστειρωμένου φίλτρου σύριγγας 0,45 μm, ώστε να παραλειφθεί ένα όσο το δυνατόν περισσότερο καθαρό διάλυμα δίχως συσσωματώματα και να επιτευχθεί ένα υψηλά ποιοτικό αποτέλεσμα χρώσης του ιστού δίχως υπολείμματα χρώσης που θα εμποδίζουν την μικροσκόπηση.

Διαδικασία:

Αφού έχει προηγηθεί με επιτυχία το στάδιο της προετοιμασίας των ιστολογικών δειγμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2, 2.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ) ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης Toluidine Blue. Μεταξύ του σταδίου ενυδάτωσης και αφυδάτωσης παρεμβάλλεται αυτός της χρώσης. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα Τολοουιδίνης για 15 λεπτά. Ακολουθεί πολύ καλό πλύσιμο των τομών με τρεχούμενο νερό βρύσης, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να μην πέφτει με πίεση πάνω στην θέση του ιστού. Αμέσως μετά ακολουθεί το στάδιο αφυδάτωσης, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών εισάγονται σε ανιούσα σειρά αλκοολών 80 % για 10 δευτερόλεπτα, 96% για 10 δευτερόλεπτα, 100% για 1 λεπτό, 100% για 1 λεπτό και ξυλόλη για 1 λεπτό. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο τοποθέτηση καλυπτρίδας, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το που αφαιρεθούν από την ξυλόλη, τότε τοποθετείται διάλυμα κόλας DPX για να κολλήσει η καλυπτρίδα, ώστε να προκύψει ένα καλό παρασκεύασμα προς μικροσκόπηση. Με την χρώση Τολοουιδίνης επιτυγχάνεται η χρώση των πυρήνων των κυττάρων με μωβ χρώμα (στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα) ενώ με μπλε χρώμα βάφονται οι γλυκοζαμινογλυκάνες.

4.1.3) Alcian Blue

Παρασκευή χρώσης:

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Χρώση Alcian Blue υπό μορφή σκόνης (SIGMA).
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου 50 ml.
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.
- Αποστειρωμένο φίλτρο σύριγγας 0,20 μm (CORNING INCORPORATED).
- Διάλυμα HCl 37% v/v.

Για την παρασκευή 50 ml χρώσεως Alcian Blue προστέθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου 500 mg σκόνης της χρώσεως, τα οποία ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και 50 ml απεσταγμένου νερού στήλης B. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος HCl 37% v/v για την ρύθμιση του pH στο 2,5. Γίνεται καλή ανακίνηση και αφού περάσουν κάποια λεπτά γίνεται το φιλτράρισμα του διαλύματος της χρώσης, με την βοήθεια αποστειρωμένου φίλτρου σύριγγας 0,20 μm, ώστε να παραλειφθεί ένα όσο το δυνατόν περισσότερο καθαρό διάλυμα δίχως συσσωματώματα και να επιτευχθεί ένα υψηλά ποιοτικό αποτέλεσμα χρώσης του ιστού δίχως υπολείμματα χρώσης που θα εμποδίζουν την μικροσκόπηση.

Διαδικασία:

Αφού έχει προηγηθεί με επιτυχία το στάδιο της προετοιμασίας των ιστολογικών δειγμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2, 2.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ) ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης Alcian Blue. Μεταξύ του σταδίου ενυδάτωσης και αφυδάτωσης παρεμβάλλεται αυτός της χρώσης. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα Alcian Blue για 15 λεπτά. Ακολουθεί πολύ καλό πλύσιμο των τομών με τρεχούμενο νερό βρύσης, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να μην πέφτει με πίεση πάνω στην θέση του ιστού. Αμέσως μετά ακολουθεί το στάδιο αφυδάτωσης, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών εισάγονται σε ανιούσα σειρά αλκοολών 80 % για 10 δευτερόλεπτα, 96% για 10 δευτερόλεπτα, 100% για 1 λεπτό, 100% για 1 λεπτό και ξυλόλη για 1 λεπτό. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο τοποθέτηση καλυπτρίδας, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το που αφαιρεθούν από την ξυλόλη, τους τοποθετείται διάλυμα κόλλας Coverquick για να κολλήσει η καλυπτρίδα, ώστε να προκύψει ένα καλό παρασκεύασμα προς μικροσκόπηση.

Με την χρώση Alcian Blue επιτυγχάνεται η χρώση των όξινων πολυσακχαριτών (πχ γλυκοζαμινογλυκάνες) της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας της βαρτονείου γέλης με μπλέ χρώμα. Ειδικότερα, οι πυρήνες στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα βάφονται με μπλέ χρώμα ενώ η εξωκυτταρική θεμέλια ουσία-κυτταρόπλασμα με ανοιχτό μπλέ.

4.1.4) Sirious Red

Παρασκευή χρώσης:

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Χρώση Sirious Red υπό μορφή σκόνης (SIGMA).
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.
- Διάλυμα οξινισμένου ύδατος.

Για την παρασκευή της χρώσης προηγήθηκε η παρασκευή οξινισμένου διαλύματος με την προσθήκη 5 ml οξινισμένου ύδατος σε 200 ml απεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια σε αυτό το διάλυμα προστέθηκαν 200 mg χρώσης Sirious Red υπό μορφή σκόνης.

Διαδικασία:

Αφού έχει προηγηθεί με επιτυχία το στάδιο της προετοιμασίας των ιστολογικών δειγμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2, 2.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ) ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης Sirious Red. Μεταξύ του σταδίου ενυδάτωσης και αφυδάτωσης παρεμβάλλεται αυτός της χρώσης. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα χρώσης Sirious Red για 60 λεπτά. Ακολουθεί πολύ καλό πλύσιμο των τομών με τρεχούμενο νερό βρύσης, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να μην πέφτει με πίεση πάνω στην θέση του ιστού. Αμέσως μετά ακολουθεί το στάδιο αφυδάτωσης, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών εισάγονται σε ανιούσα σειρά αλκοολών 80 % για 10 δευτερόλεπτα, 96% για 10 δευτερόλεπτα, 100% για 1 λεπτό, 100% για 1 λεπτό και ξυλόλη για 1 λεπτό. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο τοποθέτηση καλυπτρίδας, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το που αφαιρούνται από την ξυλόλη, τους τοποθετείται διάλυμα κόλλας Coverquick για να κολλήσει η καλυπτρίδα, ώστε να προκύψει ένα καλό παρασκεύασμα προς μικροσκόπηση.

Με την χρώση Sirious Red επιτυγχάνεται η χρώση των ινών κολλαγόνου της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας της Βαρτονείου γέλης με κόκκινο χρώμα. Οι πυρήνες, το κυτταρόπλασμα και οι μυϊκές ίνες βάφονται με κίτρινο χρώμα.

4.1.5) Orcein

Παρασκευή χρώσης:

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (KERN).
- Χρώση Orcein υπό μορφή σκόνης (SIGMA).
- Διάλυμα αιθανόλης 70%.
- Διάλυμα HCI.

Για την παρασκευή της χρώσης πραγματοποιείται διαλυτοποίηση 0,4 gr ορσεΐνης σε 100 ml αιθανόλης 70% και ακολουθείται διήθηση αυτού του διαλύματος και προσθήκη 1 ml HCl ώστε το pH της χρώσης να ρυθμιστεί σε 1-2.

Διαδικασία:

Αφού έχει προηγηθεί με επιτυχία το στάδιο της προετοιμασίας των ιστολογικών δειγμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2, 2.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ) ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης Orcein. Μεταξύ του σταδίου ενυδάτωσης και αφυδάτωσης παρεμβάλλεται αυτός της χρώσης. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα ορσεϊνης καθόλη την διάρκεια της νύχτας στους 37° C. Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70% και στην συνέχεια με τρεχούμενο νερό βρύσης. Αμέσως μετά ακολουθεί το στάδιο αφυδάτωσης, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών εισάγονται σε ανιούσα σειρά αλκοολών 80 % για 10 δευτερόλεπτα, 96% για 10 δευτερόλεπτα, 100% για 1 λεπτό, 100% για 1 λεπτό και ξυλόλη για 1 λεπτό. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο τοποθέτηση καλυπτρίδας, κατά το οποίο οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το που αφαιρεθούν από την ξυλόλη, τους τοποθετείται διάλυμα κόλλας για να κολλήσει η καλυπτρίδα, ώστε να προκύψει ένα καλό παρασκεύασμα προς μικροσκόπηση.

Με την χρώση ορσεΐνης επιτυγχάνεται η χρώση ελαστίνης της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας της Βαρτονείου γέλης με ιώδες χρώμα.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1) Ποσοτικοποίηση DNA και δομικών στοιχείων Βαρτονείου γέλης

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης ΙΙ (BIOAIR).
- Θερμαινόμενη πλάκα heatblock (THERMO SCIENTIFIC).
- Eppendorf 1, 5 ml (KISKER BIOTECH).
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού NanoDrop (THERMO SCIENTIFIC).
- Φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης (BIORAD).

- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN).
- Συσκευή θερμαινόμενης ανακίνησης (Heildoph Unimax 1010).
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία.
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (SLP LIFE SCIENCES).
- Τρυβλίο Petri 100 mm (THERMO SCIENTIFIC).
- Ορολογικές πιπέτες 10 ml (SARSTEDT).
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μΙ (GIELSON).
- Διάλυμα πρωτεϊνάσης Κ.
- Διάλυμα PBS 1x.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων της ποσοτικοποίησης του DNA και των δομικών στοιχείων του ιστού μετρήθηκε το βάρος της Βαρτονείου γέλης στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα (native) και στα αποκυτταροποιημένα πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης. Αφού πραγματοποιήθηκαν αυτά έγινε πολύ καλός τεμαχισμός των δειγμάτων με ψαλίδι και το προϊόν του καθενός τοποθετήθηκε σε διαφορετικό Eppendorf όγκου 1,5 ml. Σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 1 ml PBS 1x και 20 μl πρωτεϊνάσης K συγκέντρωσης 25 mg/ml. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε heatblock στους 55° C για όλη την διάρκεια της νύχτας για να επιτευχθεί η πλήρης διάλυση του ιστού και να παρθούν τα οι μετρήσεις μέσω φωτομέτρησης. Για την μελέτη αυτού του πρωτοκόλλου δημιουργήθηκε μια ομάδα μελέτης που συμπεριλάμβανε τους αποκυτταροποιημένους ιστούς.

<u>5.1.1) Ποσοτικοποίηση DNA και ολικών πρωτεϊνών</u>

Αφού παρελήφθησαν τα δείγματα από το heatblock πραγματοποιήθηκε μέτρηση 5 διαφορετικών δειγμάτων Βαρτονείου γέλης τόσο από μη αποκυτταροποιημένα δείγματα (native) όσο και από τα αντίστοιχα αποκυτταροποιημένα τους δείγματα. Η διαδικασία αυτή έγινε με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας με την οποία γινόταν αναρρόφηση 2-3 μl από κάθε δείγμα (Eppendorf) και πραγματοποιούνταν η μέτρηση στο μηχάνημα NanoDrop. Πριν από τις μετρήσεις είχε προηγηθεί η διαδικασία μηδενισμού του NanoDrop με τυφλό δείγμα. Στην συνέχεια λοιπόν λήφθηκαν οι τιμές των απορροφήσεων από κάθε μέτρηση και ειδικότερα για το DNA στα 280 nm ενώ για τις ολικές πρωτεΐνες στα 260 nm.

5.1.2) Ποσοτικοποίηση ολικής ποσότητας κολλαγόνου

Διαδικασία:

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας του κολλαγόνου στα native και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα Βαρτονείου γέλης συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) :

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο ποσοτικοποίησης ολικής ποσότητας κολλαγόνου σε ιστό Βαρτονείου γέλης.

 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με την χρήση των πρότυπων διαλυμάτων.

 Ομογενοποίηση του κάθε δείγματος ιστού στα Eppendorf όπως περιεγράφηκε αναλυτικά παραπάνω με την χρήση πρωτεϊνάσης Κ.

3) Αραίωση του κάθε δείγματος 1:10 με PBS 1x.

 Μεταφορά από κάθε δείγμα (Eppendorf) 50 μΙ δείγματος, με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας, σε διαφορετικό πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοδότησης 96 πηγαδιών.

5) Προσθήκη 100 μΙ διαλύματος Chloramine T/ oxidation σε κάθε πηγαδάκι.

Πολύ καλή ανάμειξη του μίγματος σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιώντας
 την αυτόματη πιπέτα με συνεχίσεις αναρροφήσεις.

- 7) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
- 8) Προσθήκη 100 μΙ αραιωμένου διαλύματος DMAB και επώαση των δειγμάτων για 90 λεπτά στους 60° C σε μηχάνημα θερμαινόμενης ανακίνησης.

9) Φωτομέτρηση του δείγματος στα 560 nm.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων και διαλυμάτων για την ποσοτικοποίηση του κολλαγόνου

Παρασκευή διαλύματος Chloramine T/Oxidation Mixture <u>Διαλύματα-εξοπλισμός:</u>

- Διάλυμα Chloramine T Concentrate.
- Oxidation buffer.
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μl.
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μl.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων και με δεδομένο πως για κάθε δείγμα απαιτούνται 100 μΙ διαλύματος Chloramine T/Oxidation Mixture υπολογίστηκε πως χρειάζονται συνολικά 1600 μΙ αυτού του διαλύματος. Επομένως, με δεδομένο πως για 100 μΙ αυτού του διαλύματος προστίθενται 6 μΙ διαλύματος Chloramine T Concentrate σε 94 μΙ Oxidation buffer για την ποσότητα παρασκευής 1600 μΙ αυτού του διαλύματος προστέθηκαν 96 μΙ Chloramine T Concentrate σε 1504 μΙ Oxidation buffer.

Παρασκευή διαλύματος Diluted DMAB

Διαλύματα-εξοπλισμός:

- Διάλυμα DMAB.
- Διάλυμα Perchloric Acid/Isopropanol.
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μl.
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μl.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων και με δεδομένο πως για κάθε δείγμα απαιτούνται 100 μΙ διαλύματος Diluted DMAB υπολογίστηκε πως χρειάζονται συνολικά 1600 μΙ αυτού του διαλύματος. Επομένως, με δεδομένο πως για 100 μΙ αυτού του διαλύματος προστίθενται 50 μΙ διαλύματος DMAB σε 50 μΙ διαλύματος Perchloric Acid/Isopropanol για την ποσότητα παρασκευής 1600 μl αυτού του διαλύματος προστέθηκαν 800 μl DMAB σε 800 μl διαλύματος Perchloric Acid/Isopropanol.

<u>Παρασκευή Hydroxyproline Standard και πρότυπης καμπύλης</u> <u>αναφοράς</u>

<u>Διαλύματα-εξοπλισμός:</u>

- Αυτόματη πιπέτα 1-10 μΙ.
- Αυτόματη πιπέτα 2-20 μl.
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μl.
- Διάλυμα Hydroxyproline Standard 1 mg/ml (SIGMA).
- Διάλυμα Chloramine T/ Oxidation Mixture (SIGMA).
- Διάλυμα Diluted DMAB (SIGMA).
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.

Αναλυτικότερα, το πρώτο πράγμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η δημιουργία πρότυπης καμπύλης με την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

- Αρχικά, γίνεται αραίωση 1:10, με 10 μΙ διαλύματος Hydroxyproline Standard 1 mg/ml να προστίθενται σε 90 μΙ απεσταγμένου νερού οπότε προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 0,1 mg/ml. Η αραίωση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια των αυτόματων πιπετών 2-20 μΙ και 20-200 μΙ για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια.
- Προσθήκη 0,2,4,6,8,10 μΙ διαλύματος Hydroxyproline Standard συγκεντρώσεως 0,1 mg/ml σε διαφορετικό πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοδότησης 96 πηγαδιών.
- Η συγκεκριμένη πρότυπη καμπύλη έχει τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα 0, 2, 4, 6, 8 και 1 μg/ well.
 - 31
4. Προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας απεσταγμένου νερού σε κάθε πηγαδάκι που έχει προστεθεί το διάλυμα Hydroxyproline Standard για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων συγκεκριμένων συγκεντρώσεων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα αναλυτικά (Πίνακας 4).

Πρότυπα διαλύματα (μg/ml)	dH₂O (µI)	Hydroxyproline Standard (µl)
Τυφλό (0)	10	0
2	8	2
4	6	4
6	4	6
8	2	8
10	0	10

- 5. Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι (της πρότυπης καμπύλης) 100 μl διαλύματος Chloramine T/Oxidation, πολύ καλή ανάμειξη με συνεχίσεις αναρροφήσεις με πιπέτα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6. Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι (της πρότυπης καμπύλης) 100 μl διαλύματος DMAB, πολύ καλή ανάμειξη με συνεχίσεις αναρροφήσεις με πιπέτα και επώαση στους 60° C για 90 λεπτά.
- Αφού λοιπόν έχουν προστεθεί σωστά οι ποσότητες των διαλυμάτων σε κάθε πηγαδάκι για την πρότυπη καμπύλη ακολουθεί η αραίωση των δειγμάτων που έχουν παραλειφθεί από το heatblock {Κεφάλαιο 5, 5.1} Ποσοτικοποίηση DNA και δομικών στοιχείων Βαρτονείου γέλης} 1:10 με PBS 1x. Αναλυτικότερα, σε μια νέα σειρά στην πλάκα μικροτιτλοδότησης (διαφορετική σειρά από αυτή των διαλυμάτων της πρότυπης καμπύλης) πραγματοποιήθηκε η εν λόγο αραίωση για κάθε δείγμα (5 native και 5

αποκυτταροποιημένα). Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 20 μΙ δείγματος και 180 μΙ PBS 1x.

- Σε άλλη σειρά της πλάκας μικροτιτλοδότησης μεταφέρονται 50 μΙ δείγματος από κάθε πηγαδάκι που πραγματοποιήθηκε η αραίωση 1:10.
- Προσθήκη σε αυτή την σειρά 100 μΙ διαλύματος Chloramine/ Oxidation σε κάθε πηγαδάκι.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό σημείο.
- Προσθήκη 100 μΙ του διαλύματος DMAB που παρασκευάστηκε σε κάθε πηγαδάκι και επώαση στους 60° C για 90 λεπτά στη συσκευή θερμαινόμενης ανακίνησης, ενώ η πλάκα μικροτιτλοδότησης είναι τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο.
- Τέλος, φωτομέτρηση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης στα 560 nm.



5.1.3) Ποσοτικοποίηση πρωτεογλυκανών

Αφού παρεληφθούν τα δείγματα από το heatblock {ΒΛΕΠΕ 5.1) Ποσοτικοποίηση DNA και δομικών στοιχείων Βαρτονείου γέλης} εκτελείται το παρακάτω πρωτόκολλο για την ποσοτικοποίηση των πρωτεογλυκανών (ΠΙΝΑΚΑΣ 4):

<u>Πίνακας 4:</u> Πρωτόκολλο ποσοτικοποίησης πρωτεογλυκανών σε ιστό Βαρτονείου γέλης.

- Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με την χρήση πρότυπων διαλυμάτων.
- Μεταφορά 40 μΙ από κάθε δείγμα που έχει αραιωθεί προηγουμένως 1:10 με PBS 1x, σε διαφορετική σειρά από αυτή των πρότυπων διαλυμάτων.
- Μεταφορά 40 μΙ από κάθε δείγμα χωρίς να έχουν αραιωθεί σε διαφορετική σειρά της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
 - 4. Προσθήκη 250 μΙ από το διάλυμα DMB σε κάθε πηγαδάκι.
 - 5. Φωτομέτρηση του δείγματος στα 525 nm.

Η φωτομέτρηση θα πρέπει να έχει πραγματοποιηθεί εντός 60 δευτερολέπτων.

Παρασκευή διαλύματος Stock DMB 16 μg/ml

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- 1,9 Dimethylene Blue υπό μορφή σκόνης
- Διάλυμα Formic Acid συγκέντρωσης 26,5 Μ.
- Διάλυμα αλκοόλης 70%.
- Sodium Formate υπό μορφή σκόνης.
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.
- Ζυγός ακριβείας (KERN).
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μΙ.
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μl.

Για την παρασκευή του διαλύματος DMB 16 μg/ml πραγματοποιείται διάλυση 800 μg 1,9 Dimethylene Blue σε 2,5 ml αλκοόλης 70%. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl από Formic Acid συγκέντρωσης 26,5 M και προσθήκη 100 mg από το Sodium Formate. Τέλος, προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι το διάλυμα να φτάσει τα 50 ml.

Παρασκευή Φωσφορικού διαλύματος

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Διάλυμα NAH₂PO₄ συγκέντρωσης 0,1 Μ.
- $\Delta_1 \alpha \lambda_0 \mu \alpha Na_2 HPO_4 \sigma_0 \gamma \kappa \epsilon v \tau \rho_0 \sigma_0 \sigma_0, 1 M.$
- Ηλεκτρική πιπέτα (CAPP).
- Πιπέτα προπυλενίου 50 ml.

Για την Παρασκευή 200 ml φωσφορικού διαλύματος έγινε ανάμιξη 137 ml διαλύματος NAH₂PO₄ συγκέντρωσης 0,1 M με 63 ml διαλύματος Na₂HPO₄ συγκέντρωσης 0,1 M.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Εξοπλισμός-Διαλύματα:

- Chondroitin Suphate υπό μορφή σκόνης.
- PBS 1x.
- Απεσταγμένο νερό στήλης Β.
- Αυτόματη πιπέτα 1-10 μΙ.
- Αυτόματη πιπέτα 20-200 μl.
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μl.
- Cryotubes των 1,5 ml.
- Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων απαιτείται αρχικά η παρασκευή του διαλύματος Stock Chondroitin Suphate 1 mg/ml.
- Η παρασκευή του διαλύματος Stock Chondroitin Suphate 1 mg/ml γίνεται με διάλυση 10 mg Chondroitin Suphate σε 10 ml PBS 1x.
- Τα πρότυπα διαλύματα που προκύπτουν έχουν συγκεντρώσεις 0, 3, 6, 12, 25, 50, 100, 150 και 200 mg/ml.
- Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται με αραίωση του διαλύματος Stock Chondroitin Suphate 1 mg/ml με απεσταγμένο νερό σε ποσότητες που φαίνονται στο παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 5):

Συγκέντρωση πρότυπων	Διάλυμα Stock	dH₂O
διαλυμάτων	(µI)	(µI)
(µg/ml)		
0	0	500
3	1,5	498,5
6	3	497
12	6	494
25	12,5	487,5

50	25	475
100	50	450
150	75	425
200	100	400

Διαδικασία:

Αναλυτικότερα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα σε μικρά cryotubes των
 1,5 ml με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων του Stock διαλύματος και απεσταγμένου νερού.
- Μεταφορά σε μια σειρά στην πλάκα μικροτιτλοδότησης 40 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα σε ξεχωριστά πηγαδάκια με την βοήθεια της κατάλληλης κάθε φορά αυτόματης πιπέτας ώστε να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια.
- Μεταφορά 40 μΙ από κάθε δείγμα που έχει αραιωθεί προηγουμένως 1:10 με PBS 1x, σε διαφορετική σειρά από αυτή των πρότυπων διαλυμάτων.
- Μεταφορά 40 μΙ από κάθε δείγμα χωρίς να έχει γίνει αραίωση (5 native και 5 αποκυτταροποιημένα) σε μια διαφορετική σειρά της πλάκας.
- 5. Προσθήκη 250 μΙ DMB σε όλα τα πηγαδάκια και σε όλες τις σειρές της πλάκας (στην σειρά των πρότυπων διαλυμάτων, των αραιωμένων δειγμάτων και στην σειρά των μη αραιωμένων δειγμάτων).
- Φωτομέτρηση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης στα 525 nm.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα

6.1) Ιστολογικές τομές που πραγματοποιήθηκε η μελέτη

Η αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης της βαρτονείου γέλης με σκοπό την χρήση της ως βιοϋλικό στην αναγεννητική ιατρική πραγματοποιήθηκε σε τρείς διαφορετικές ιστολογικές τομές. Άλλωστε όπως αναλύθηκε διεξοδικώς υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση του ιστού ως τρισδιάστατο ικρίωμα. Έτσι, η μελέτη πραγματοποιήθηκε για 3 διαφορετικές τομές οι οποίες καλύπτουν το λεγόμενο τρισδιάστατο ικρίωμα και ονομάζονται tagential, long και circ. Οι τομές αυτές αναπαρίστανται στην παρακάτω εικόνα:



6.2) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης με βάση τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά

Η επίδραση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης στον ιστό βαρτονείου γέλης αξιολογήθηκε αρχικά για τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του ιστού πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης ενώ μετρήσεις έγιναν και στα native δείγματα δηλαδή σε αυτά που δεν αποκυτταροποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μορφομετρικών χαρακτηριστικών (βάρος, μήκος, πλάτος, πάχος, ολική επιφάνεια, πόροι) παρατίθενται παρακάτω στα διαγράμματα που ακολουθούν:



Διάγραμμα 1: Βάρος βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά μη σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,108 > 0,05.

Το βάρος της βαρτονείου γέλης **αυξήθηκε** μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης **κατά 19,2%**. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά μη σημαντική.



Διάγραμμα 2: Μήκος βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά μη σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,0539 > 0,05.

Το μήκος της βαρτονείου γέλης μειώθηκε μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης κατά 30,68% σε σχέση με το αρχικό. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά μη σημαντική (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 3: Πλάτος βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά μη σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,325 > 0,05.

Το πλάτος της βαρτονείου γέλης μειώθηκε μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης κατά 20,44% σε σχέση με το αρχικό. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά μη σημαντική.



Διάγραμμα 4: Η ολική επιφάνεια της Βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά μη σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,4512 > 0,05.

Η ολική επιφάνεια της βαρτονείου γέλης **μειώθηκε** μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης **κατά 37,2%** σε σχέση με την αρχική. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά μη σημαντική.



Διάγραμμα 5: Πάχος της βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,0017 < 0,05**.

Το πάχος της βαρτονείου γέλης **αυξήθηκε** μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης **κατά 79,63%** σε σχέση με το αρχικό. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 6: Διάμετρος των πόρων της βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,0017 < 0,05**. Το διάγραμμα αναφέρεται στην ιστολογική τομή tagential.

Η διάμετρος των πόρων της βαρτονείου γέλης, για την ιστολογική τομή **tagential**, **αυξήθηκε** μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης **κατά 166,6%** σε σχέση με την αρχική. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 7: Διάμετρος των πόρων της βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε native (μη αποκυτταροποιημένα) δείγματα και σε Decel (αποκυτταροποιημένα) δείγματα. Στατιστικά σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,0021 < 0,05**. Το διάγραμμα αναφέρεται στην ιστολογική τομή long.

Η διάμετρος των πόρων της Βαρτονείου γέλης, για την ιστολογική τομή **long**, **αυξήθηκε** μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης **κατά 76,3%** σε σχέση με την αρχική. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 8: Διάμετρος των πόρων της βαρτονείου γέλης πριν και μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης σε μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και σε αποκυτταροποιημένα δείγματα. Στατιστικά σημαντική η διαφορά πριν και μετά την διαδικασία της αποκυτταροποίησης p=0,00000000451 < 0,05***. Το διάγραμμα αναφέρεται στην ιστολογική τομή circ.

Η διάμετρος των πόρων της βαρτονείου γέλης, για την ιστολογική τομή circ, αυξήθηκε μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης κατά 193,5% σε σχέση με την αρχική. Η μεταβολή αυτή αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

6.3) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων

Η αξιολόγηση της διαδικασίας αποκυτταροποίησης διενεργήθηκε εκτός των παραπάνω και με την μελέτη των ιστολογικών παρασκευασμάτων. Οι ιστολογικές χρώσεις που πραγματοποιήθηκαν και στα μη αποκυτταροποιημένα και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα δείξανε την απομάκρυνση των κυτταρικών και πυρηνικών υλικών αλλά την διατήρηση των σημαντικότερων συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας του ιστού βαρτονείου γέλης.



Εικόνα 9 : (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ):



Εικόνα 10: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ):



Εικόνα 11: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x . Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, scale bar 100 μm.



Εικόνα 12: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x . Χρώση Αομοι Αρμοι Αρμ



Εικόνα 13: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (ΣΤ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (ΣΤ):



Εικόνα 14: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x . Χρώση Alcian Blue, scale bar 100 μm.



Εικόνα 15: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x . Χρώση Τολοουιδίνης, scale bar 100 μm.



Εικόνα 16: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 40x.



Εικόνα 17: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ):



Εικόνα 18: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x . Χρώση Sirious Red, scale bar 100 μm.



Εικόνα 19: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Σ):



Εικόνα 20: (Α): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x, (Β): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x . Χρώση Sirious Red, scale bar 100 μm.



Εικόνα 21: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής tagential, μεγέθυνση 40x . Χρώση Ορσεΐνης, scale bar 100 μm.



Εικόνα 22: (A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 10x (Ε): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (ΣΤ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής long, μεγέθυνση 20x (ΣΤ):



Εικόνα 23:(A): Μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 10x, (B): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x (Δ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Γ): μη αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 20x (Σ): αποκυτταροποιημένο δείγμα βαρτονείου γέλης ιστολογικής τομής circ, μεγέθυνση 40x . Χρώση Ορσεΐνης, scale bar 100 μm.







Μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης φάνηκε μέσω των μετρήσεων ποσοτικοποίησης του DNA πως πραγματοποιήθηκε **απομάκρυνση** του γενετικού υλικού κατά **92,4%** στα αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού βαρτονείου γέλης σε σύγκριση με τα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα.

<u>6.5) Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω της</u> ποσοτικοποίησης των δομικών συστατικών του ιστού βαρτονείου γέλης



Διάγραμμα 25: Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω ποσοτικοποίησης των γλυκοζαμινογλυκανών στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα. Η διαφορά στην περιεκτικότητα μεταξύ των μη αποκυτταροποιημένων και των αποκυτταροποιημένων δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντική p=0.0036<0.05**.

Μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης φάνηκε μέσω των μετρήσεων ποσοτικοποίησης των γλυκοζαμινογλυκανών πως πραγματοποιήθηκε **μείωση** αυτών κατά **78,5%** στα αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού βαρτονείου γέλης σε σύγκριση με τα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα.



Διάγραμμα 26: Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω ποσοτικοποίησης των ολικών πρωτεϊνών στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα. Η διαφορά στην περιεκτικότητα μεταξύ των μη αποκυτταροποιημένων και των αποκυτταροποιημένων δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντική p=0.0088<0.05**.

Μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης φάνηκε μέσω των μετρήσεων ποσοτικοποίησης των ολικών πρωτεϊνών πως πραγματοποιήθηκε **μείωση** αυτών κατά **20,8%** στα αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού βαρτονείου γέλης σε σύγκριση με τα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα.



Διάγραμμα 27: Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω ποσοτικοποίησης κολλαγόνου με την μέθοδο υδροξυπρολίνης στα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα και στα αποκυτταροποιημένα δείγματα. Η διαφορά στην περιεκτικότητα μεταξύ των μη αποκυτταροποιημένων και των αποκυτταροποιημένων δειγμάτων είναι στατιστικά μη σημαντική p=0.0579<0.05.

Μετά την διαδικασία αποκυτταροποίησης φάνηκε μέσω των μετρήσεων ποσοτικοποίησης του κολλαγόνου πως πραγματοποιήθηκε **μείωση** κατά **23,9%** στα αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού βαρτονείου γέλης σε σύγκριση με τα μη αποκυτταροποιημένα δείγματα.

<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>

Η χρήση της βαρτονείου γέλης ως βιοϋλικό στην αναγεννητική ιατρική αλλά και ειδικότερα ως ικρίωμα στην ιστομηχανική για την ανάπλαση ιστών αποτελεί σήμερα στην επιστημονική κοινότητα μια μεγάλη πρόκληση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την κατά κόρον αύξηση των μελετών για αυτή την τελευταία δεκαετία. Μάλιστα, σε συνδιασμό με τους περιορισμούς που υπάρχουν στις μεταμοσχεύσεις ιστών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενα μελλοντική εναλλακτική πρόταση στο εν λόγο ζήτημα, όπως καταδεικνύουν οι έως τώρα έρευνες αλλά και τα πολύ ελπιδοφόρα προκλινικά και κλινικά αποτελέσματα.

Βασικός στόχος της μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης του ιστού της βαρτονείου γέλης, προερχόμενη από τον ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, με κύριο σκοπό την χρήση αυτής ως ικρίωμα στην αναγεννητική ιατρική. Για την επίτευξη αυτού ακολουθήθηκαν διάφορα στάδια εργασίας, τα οποία έδωσαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα και συμπεράσματα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αποκυτταροποίηση του ιστού χρησιμοποιώντας τρία διαλύματα το CHAPS, το SDS και το α-MEM +40% FBS. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την δράση αυτών των διαλυμάτων αξιολογήθηκαν με βάση την διεθνή βιβλιογραφία και τις ανάλογες κατά μέρους μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην αποκυτταροποίηση του εν λόγο ιστού. Πιο συγκεκριμένα, το CHAPS αλλά και το SDS, όπως αναφέρεται και στις μελέτες των Crapo et al. 2011; Keane et al. 2015; Gilbert et al. 2006, αποτελούν διαφορετική κατηγορία απορρυπαντικών, τα οποία όταν συνδυάζονται σε ένα πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης, τότε επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό η αποκυτταροποίηση του ιστού αλλά με κάποιες διαταραχές στην δομή και την σύσταση του. Αναλυτικότερα, με το CHAPS επιδιώκεται η απομάκρυνση των κυττάρων του ιστού ενώ παρουσιάζει και αυξημένη τάση για μετουσίωση πρωτεϊνών του ιστού χωρίς όμως να επηρεάζει το κολλαγόνο, ενώ δεν απομακρύνει το γενετικό υλικό. Αντίθετα, με το SDS επιδιώκεται η αφαίρεση των κυτταρικών συστατικών (π.χ. κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μεμβρανών κ.α.) και υπολειμμάτων αυτών, ωστόσο τείνει να διαταράσσει την του ιστού προκαλώντας μείωση της συγκέντρωσης φυσική δομή γλυκοζαμινογλυκανών, κολλαγόνου και γενικότερα των ολικών πρωτεϊνών.

Βέβαια, εδώ οφείλεται να τονιστεί πως και τα δύο απορρυπαντικά διαταράσσουν σε διαφορετικά ποσοστά την σύσταση του ιστού και πως δεν υπάρχει τρόπος αποκυτταροποίησης ενός ιστού δίχως να προκληθούν διαταραχές στην δομή και την σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Όλα τα παραπάνω παρατηρήθηκαν, καταγραφήκαν και αναλυθήκαν διεξοδικώς σε αυτή την μελέτη αλλά και σε αυτές της διεθνούς βιβλιογραφίας που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πιο συγκεκριμένα, η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης του ιστού βαρτονείου γέλης επεκτάθηκε και στις μεταβολές που προκλήθηκαν στα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του ιστού. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους του αποκυτταροποιημένου ιστού κατά 19% και μάλιστα αξιολογήθηκε ως στατιστικά μη σημαντική. Η αύξηση του βάρους ήταν αναμενόμενη, καθώς είναι γνωστό πως το SDS αυξάνει το αρνητικό φορτίο των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας λόγω της υδροφιλικότητας του, με αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας ύδατος του ιστού, άρα και την αύξηση του βάρους του. Μάλιστα αύξηση κατά 79,63% παρατηρήθηκε στο πάχος του αποκυτταροποιημένου ιστού σε σύγκριση με τον αρχικό μη αποκυτταροποιημένο, κάτι που αξιολογήθηκε στατιστικά σημαντικό. Επίσης, αυξήσεις παρατηρήθηκαν και στις διαμέτρους των πόρων TOU αποκυτταροποιημένου ιστού και στις τρείς ιστολογικές τομές και κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, στην ιστολογική τομή tagential αύξηση 166,6%, στην long 76,3% και στην circ 193,5%, όλες στατιστικώς σημαντικές. Στις έρευνες των Beiki et al. 2017; Kehtari et al. 2019 η διάμετρος των πόρων μετά την αποκυτταροποίηση ποικίλει και ως διάστημα αναφοράς καταγράφεται 60-200 μm, το οποίο είναι πολύ κοντά με το διάστημα 64-151 μm της εν λόγο ερευνητικής πτυχιακής. Η αύξηση της διαμέτρου των πόρων αναφέρεται ως μια θετική έκβαση των αποκυτταροποιήσεων στους πορώδης ιστούς, όπως η βαρτόνειος γέλη (Penolazzi et al. 2020; Kehtari et al. 2019; Beiki et al. 2017; Mathew et al. 2016). Η αύξηση αυτή ευνοεί την διαπερατότητα και την ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών όταν ο αποκυτταροποιημένος ιστός εισάγεται ως ικρίωμα σε έναν ζώντα οργανισμό (Mathew et al. 2016) ενώ αναφέρονται και αυξήσεις στην ζωτικότητα, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων που εγκαθίστανται σε αυτόν. Το τελευταίο επιτυγχάνεται από την ευκολότερη διείσδυση των κυττάρων στο ικρίωμα, διευκολύνοντας την

επανακυτταροποίηση αυτού από τον εκάστοτε επιθυμητό κυτταρικό πληθυσμό, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται η διασυνδεσιμότητα μεταξύ ικριώματος και του ιστού που εισάγεται (Penolazzi et al. 2020; Kehtari et al. 2019; Beiki et al. 2017). Μάλιστα, ενισχύει ή διατηρεί τις μηχανικές ιδιότητες του ιστού (Beiki et al. 2017) και διευκολύνει την προσαρμογή του στο νέο μικροπεριβάλλον που εισάγεται. Ακόμη, με την εν λόγο αύξηση επιτυγχάνεται ευκολότερα η απόρριψη των ουσιών, προκύπτουν από τις διαδικασίες άχρηστων που που πραγματοποιούνται σε αυτόν (πχ από τα κύτταρα), όταν εισαχθεί στον υποψήφιο προς ανάπλαση ιστό (Mathew et al. 2016). Ένας από τους πιθανούς λόγους που συμβαίνει αυτή η αύξηση είναι η απομάκρυνση των κυττάρων από τον ιστό, με αποτέλεσμα αυτός να γίνεται ελαστικότερος. Άλλοι παράμετροι που μετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν όσο αναφορά τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του αποκυτταροποιημένου ιστού βαρτονείου γέλης σε σύγκριση με τον αρχικό μη αποκυτταροποιημένο είναι οι εξής: παρατήρηση μείωσης στο μήκος του αποκυτταροποιημένου ιστού κατά 30,6% σε σύγκριση με το αρχικό, μείωση κατά 20,4% του πλάτους και μείωση της ολικής επιφάνειας του ιστού κατά 37,2%. Οι μεταβολές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές. Ωστόσο, σε άλλες έρευνες που θα σχετίζονται με την αξιοποίηση του εν λόγο ικριώματος, πχ επανακυτταροποίηση του ικριώματος ή χρήσης του με σκοπό την γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη επούλωση τραυματισμών, ίσως να παίζουν ρόλο και να μπορούν να αξιολογηθούν θετικά ή αρνητικά για τα εν λόγο εγχειρήματα.

Σύμφωνα, με τις εικόνες των ιστολογικών παρασκευασμάτων χρώσεως αιματοξυλίνης-εωσίνης η διαδικασία αποκυτταροποίησης αξιολογείται ως επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκε απομάκρυνση των περισσότερων (η πλήρη απομάκρυνση έχει διατυπωθεί ως αδύνατη) πυρηνικών και κυτταρικών 6.3 υπολειμμάτων (ΚΕΦΑΛΑΙΟ Αξιολόγηση πρωτοκόλλου TOU αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων, σελ. 45-47, εικόνες 9,10,11). Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε και στις τρείς ιστολογικές τομές, οπότε αξιολογήθηκαν και οι τρείς διαστάσεις του ικριώματος ως προς την απομάκρυνση του πυρηνικού υλικού. Μάλιστα, αυτός ο τρόπος ελέγχου για την επιτυχή ή όχι απομάκρυνση των πυρήνων από τον ιστό αναφέρεται και στις μελέτες των Mallis et al. 2020; Penolazzi et al. 2020; Xu et al. 2020; Kehtari et al. 2019; Mallis et al. 2018; Beiki et al. 2017; Jadalannagari et al. 2017; Crapo et al. 2011. Και στην εν λόγο πτυχιακή αλλά και στις παραπάνω έρευνες
<<χρησιμοποιείται>> η δυνατότητα της χρώσης αιματοξυλίνης-εωσίνης να βάφει του πυρήνες με μωβ χρώμα και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με ροζ χρώμα και έτσι γίνεται η παρατήρηση-αξιολόγηση για την ύπαρξη ή όχι των πυρήνων στα αποκυτταροποιημένα δείγματα σε σχέση με τα φυσικά μη αποκυτταροποιημένα. Επιπροσθέτως, η διατήρηση των δομικών στοιχείων του ιστού μετά την αποκυτταροποίηση έστω και σε μικρότερες συγκεντρώσεις επαληθεύεται από τις εικόνες των ιστολογικών παρασκευασμάτων με την εκάστοτε χρώση για το χαρακτηριστικό που απαιτείται να εντοπιστεί. Ειδικότερα, το περιεχόμενο του ιστού σε πρωτεογλυκάνες και συγκεκριμένα των θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών παρατηρείται χρησιμοποιώντας τις χρώσεις alcian blue (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.3 Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων, σελ. 48-50, εικόνες 12,13,14) και τολοουιδίνης (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.3 Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων, σελ. 51-53, εικόνες 15,16,17). Παρατηρώντας τις εικόνες αυτές με την βοήθεια των χρώσεων και του μικροσκοπίου συμπεραίνεται-παρατηρείται πως το περιεχόμενο του ιστού στις εν λόγο ουσίες παραμένει πρακτικά αμετάβλητο, διότι η μικρή μείωση αυτών δεν γίνεται αντιληπτή στα αποκυτταροποιημένα δείγματα ιστού και δεν φαίνεται να επηρεάζεται η συνοχή και η δομή του ιστού. Ανάλογες εικόνες ιστολογικών παρασκευασμάτων αποκυτταροποιημένου και μη αποκυτταροποιημένου ιστού βαρτονείου γέλης, που έχουν χρωματιστεί με alcian blue και τολοουιδίνη, υπάρχουν στις μελέτες των Mallis et al. 2020, 2020; Xu et al. 2020. Επίσης, με την βοήθεια της χρώσης Sirious Red παρατηρήθηκε η διατήρηση και η ύπαρξη των ινών κολλαγόνου στον αποκυτταροποιημένο ιστό, δίχως κάποια μεταβολή σε σύγκριση με τις ίνες κολλαγόνου του μη αποκυτταροποιημένου ιστού (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.3 Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων, σελ. 54-56, εικόνες 18,19,20). Εικόνες ιστολογικών παρασκευασμάτων βαρτονείου γέλης, που έχουν χρωματιστεί με Sirious red και παρατηρούνται με ανάλογο τρόπο οι ίνες κολλαγόνου, υπάρχουν στην έρευνα των Mallis et al. 2020, αλλά και στην μελέτη των Xu et al. 2020, στην οποία εκτός από τον φυσικό μη παρουσιάζονται αποκυτταροποιημένο ιστό και εικόνες από TOV αποκυτταροποιημένο ιστό με την εν λόγο χρώση. Τέλος, λήφθηκαν εικόνες ιστολογικών παρασκευασμάτων με χρώση ορσεΐνης και παρατηρήθηκε η

διατήρηση και η ύπαρξη των ινών ελαστίνης στον αποκυτταροποιημένο ιστό, μεταβολές, όπως αυτές παρουσιάζονται δίχως στον **Φυσικό** μŋ αποκυτταροποιημένο ιστό (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.3 Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω των ιστολογικών παρασκευασμάτων, σελ. 57-59, εικόνες 21,22,23). Σε αυτό το σημείο κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί πως οι παραπάνω παρατηρήσεις, που αξιολογήθηκαν με την βοήθεια των χρώσεων, πραγματοποιήθηκαν σε κάθε χρώση και στις τρείς ιστολογικές τομές και εξήχθησαν τα ίδια συμπεράσματα. Επομένως, και στις τρείς διαστάσεις του ιστού παρατηρήθηκε επιτυχής απομάκρυνση του πυρηνικού και κυτταρικού υλικού αλλά και η διατήρηση της συνοχής, της δομής και της σύστασης της εξωκυττάριας ουσίας στις παραπάνω ουσίες, όπως αναλύθηκε και περιεγράφηκε διεξοδικώς.

Επιπλέον, η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης του ιστού βαρτονείου γέλης επεκτάθηκε και με πειράματα ποσοτικοποίησης των δομικών στοιχείων του ιστού, τα οποία δείξανε μείωση της συγκέντρωσης αυτών μετά την αποκυτταροποίηση. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση κατά 23,9% της ολικής ποσότητας κολλαγόνου, μείωση κατά 20,8 % της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών (στατιστικά σημαντική) και κατά 78,5 % της συγκέντρωσης των θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών (στατιστικά σημαντική). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε σχετική αρμονία με αυτά παρόμοιων βιβλιογραφικών ερευνών και πιο συγκεκριμένα: στην μελέτη των Jadalannagari et al. 2017 η μεταβολή των θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών ήταν 78% (μόλις 0,5 % απόκλιση). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες των Penolazzi et al. 2020; Xu et al. 2020; Kehtari et al. 2019; Basiri et al. 2019; Beiki et al. 2017, or $\mu\epsilon\tau\alpha\beta$ ολές της συγκέντρωσης αυτών μετά την αποκυτταροποίηση του ιστού ήταν μικρότερες της τάξεως 10%-50%. Αυτό εξηγείται διότι έχουν ακολουθηθεί διαφορετικά πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης με διαφορετικούς μεθόδους και απορρυπαντικά, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται σε διαφορετικό ποσοστό η σύσταση του ιστού. Όσο αναφορά για το ποσοστό της μείωσης της συγκέντρωσης του κολλαγόνου παρατηρείται αρκετά μεγάλη συνάφεια με αυτά ανάλογων ερευνών Penolazzi et al. 2020; Xu et al. 2020; Basiri et al. 2019; Beiki et al. 2017, στις οποίες ποικίλει από μείωση κατά 4% έως 20%. Σε κοντινά όρια αναφοράς κυμαίνονται και οι μελέτες των Basiri et al. 2019; Stocco et al. 2014, για το ποσοστό μείωσης των ολικών πρωτεϊνών μετα την αποκυτταροποίηση του ιστού. Επίσης, με την

χρήση του τρίτου αποκυτταροποιητικού διαλύματος α-MEM+40% FBS επετεύχθη, όπως έδειξαν τα πειράματα ποσοτικοποίησης του DNA, η σχεδόν πλήρης απομάκρυνση του DNA στον αποκυτταροποιημένο ιστό, καθώς διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της συγκέντρωσης DNA κατά 92,4 %. Μάλιστα, η συγκέντρωση DNA στον αποκυτταροποιημένο ιστό βρέθηκε κάτω από 50 ng/mg ξηρού ιστού, κάτι που αποτελεί σημαντικότατη προϋπόθεση για να χαρακτηριστεί επιτυχημένη ως προς αυτό το κομμάτι η αποκυτταροποίηση, πληροφορία που αναφέρεται μάλιστα και στην μελέτη των Crapo et al. 2011. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι τα ικριώματα που εισάγονται σε έναν λήπτη οργανισμό για να φέρουν εις πέρας την λειτουργία τους πρέπει να μην αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό του σύστημα. Αυτό επιδιώκεται διότι αν αναγνωριστεί το ικρίωμα από το ανοσοποιητικό, τότε επάγεται μια διαδικασία αντιδράσεων, που αναφέρθηκαν 2.4 διεξοδικώς στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ ανοσιακή απόκριση έναντι αποκυτταροποιημένων δομών. Έτσι, η ελάχιστη συγκέντρωση DNA που βρέθηκε μετά την αποκυτταροποίηση του ιστού βοηθάει στην εκπλήρωση αυτού του στόχου. Ανάλογες μειώσεις της τάξεως 90% πάνω της συγκέντρωσης DNA στον αποκυτταροποιημένο ιστό αναφέρονται και στις μελέτες των Penolazzi et al. 2020; Xu et al. 2020; Basiri et al. 2019; Kehtari et al. 2019; Beiki et al. 2017; Jadalannagari et al. 2017 ενώ σε αυτές των Gogiel, Bańkowski, and Jaworski 2003 και Dan et al. 2017 αναφέρεται η σημασία της μείωσης αυτού σε ελάχιστα επίπεδα στον αποκυτταροποιημένο ιστό. Επομένως, η παρατήρηση της απομάκρυνσης της μεγαλύτερης ποσότητας του κυτταρικού και πυρηνικού υλικού μέσω της ιστολογικής χρώσης αιματοξυλίνηςεωσίνης και της ποσοτικοποίησης του DNA σε ελάχιστα επίπεδα στον αποκυτταροποιημένο ιστό, και κάτω από 50 ng/mg ξηρού ιστού, καθιστά σύμφωνα κιόλας με την μελέτη των Crapo et al. 2011 την αποκυτταροποίηση επιτυχημένη.

Λόγω των προοπτικών και των αισιόδοξων κλινικών και προκλινικών αποτελεσμάτων για χρήση της βαρτόνειο γέλης ως ικρίωμα στην αναγεννητική ιατρική, αλλά και της ενδελεχούς έρευνας των τελευταίων ετών της επιστημονικής κοινότητας για τον εν λόγο ιστό, θα ήταν ενδιαφέρον προέκταση της εν λόγο μελέτης σε ειδικότερο πλαίσιο. Συγκεκριμένα, θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρήσιμο, να διεξαχθεί έρευνα για τις συνέπειες που ίσως έχει η

μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, οι οποίες βρέθηκαν και στατιστικά σημαντικές, σε εφαρμογές του αποκυτταροποιημένου ιστού βαρτονείου γέλης τόσο ως ικρίωμα όσο και στην υποστήριξη ανακαλλιέργειας κυττάρων σε αυτή. Μάλιστα, στην μελέτη των Gilbert et al. 2006 αναφέρεται πως η αφαίρεση πρωτεϊνών συγκόλλησης, μια τέτοια πρωτεΐνη είναι και το κολλαγόνο, και γλυκοζαμινογλυκανών από ένα ικρίωμα μπορεί να επιβραδύνει την μετανάστευση κυττάρων σε αυτό και να διαταράξει την βιοδραστικότητα του. Ακόμη, αναφέρεται πως η διαταραχή του κολλαγόνου δικτύου είναι πιθανό να αλλάξει την μηχανική συμπεριφορά του ικριώματος και να επέλθει αλλαγή στο μηχανικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα. Έτσι, θα ήταν σημαντικό να ελεγχθεί με μελέτη κατά πόσο η μείωση των συγκεντρώσεων αυτών των ουσιών προκαλούν τις συνέπειες αυτές, οι οποίες είναι θεμελιώδους σημασίας για την χρήση του ικριώματος. Επίσης, προτείνεται η διεξαγωγή έρευνας για το αν αυτή η υπέρμετρη αύξηση της διαμέτρου των πόρων αποτελεί μόνο πλεονέκτημα ή διαταράσσει κάποια σημαντική ιδιότητα του ιστού όταν χρησιμοποιείται σε εφαρμογές στην ιστομηχανική. Τέλος, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελέτη θα ήταν η ποσοτικοποίηση των κύριων αυξητικών παραγόντων του ιστού και σε ποιο ποσοστό αυτοί διαταράχθηκαν κατά την αποκυτταροποίηση, διότι αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία ως θεμελιώδους σημασίας η ύπαρξη και οι ρόλοι τους για την χρήση του εν λόγο ιστού ως ικρίωμα στην αναγεννητική ιατρική. Μάλιστα, η σημασία των παραπάνω συστατικών για το πως δρούν, τι προσφέρουν και πως είναι χρήσιμα στο εν λόγο ικρίωμα, αλλά και ο ρόλος των πόρων αναφέρονται ενδελεχώς στην μελέτη των Converse et al. 2018. Έτσι, αυξάνεται το ενδιαφέρον να ερευνηθεί κατά πόσο υπάρχουν αλλαγές στην συμπεριφορά του ικριώματος μετά από τις μεταβολές της περιγραφόμενης αξιολόγησης της εν λόγο αποκυτταροποιήσεως.

<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</u>

Συμπερασματικά, ο ιστός βαρτονείου γέλης θα μπορούσε να αποτελέσει υποψήφια πηγή για ανάπτυξη ικριωμάτων φυσικής εξωκυττάριας μήτρας και γενικότερα ως βιοϋλικό προς χρήση σε εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής (ανάπλαση χόνδρινου ιστού, ενίσχυση υδροπηκτωμάτων ανάπλασης ιστών, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση κυττάρων για την επούλωση τραυματισμών κ.α.). Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται κρίνοντας από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της αποκυτταροποίησης, τα οποία σε μεγάλο βαθμό συμπίπτουν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας, και οδηγούν στην άποψη πως ο εν λόγο ιστός διατηρεί τα ωφέλιμα χαρακτηριστικά του, σε μεγάλο βαθμό, για να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα. Ωστόσο, η μελέτη θεωρείται περιορισμένη και απλώς ένα κομμάτι της ολικής διαδικασίας για την δημιουργία ικριώματος από τον εν λόγο ιστό. Γι' αυτό τον λόγο απαιτούνται περισσότερα πειράματα συμπεριλαμβανομένου της εμβιομηχανικής και πρωτεωμικής ανάλυσης, της κυτταροτοξικότητας, αλλά και της μεταμόσχευσης σε ζωικά μοντέλα ώστε να διασαφηνιστεί με ασφάλεια η χρήση του ιστού βαρτονείου γέλης ως βιοϋλικό στην αναγεννητική ιατρική.

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

- Appel, Alyssa A., Mark A. Anastasio, Jeffery C. Larson, and Eric M. Brey. 2013. "Imaging Challenges in Biomaterials and Tissue Engineering." *Biomaterials* 34(28):6615–30.
- Atala, Anthony. 2009. "Engineering Organs." Current Opinion in Biotechnology 20(5):575–92.
- Atala, Anthony. 2012. "Regenerative Medicine Strategies." *Journal of Pediatric Surgery* 47(1):17–28.
- Badylak, Stephen F., and Thomas W. Gilbert. 2008. "Immune Response to Biologic Scaffold Materials." *Seminars in Immunology* 20(2):109–16.
- Basiri, Arefeh, Mehdi Farokhi, Mahmoud Azami, Somayeh Ebrahimi-Barough, Abdolreza Mohamadnia, Morteza Rashtbar, Elham Hasanzadeh, Narges Mahmoodi, Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, and Jafar Ai. 2019. "A Silk Fibroin/Decellularized Extract of Wharton's Jelly Hydrogel Intended for Cartilage Tissue Engineering." *Progress in Biomaterials* 8(1):31–42.
- Beiki, Bahareh, Bahman Zeynali, and Ehsan Seyedjafari. 2017. "Fabrication of a Three Dimensional Spongy Scaffold Using Human Wharton's Jelly Derived Extra Cellular Matrix for Wound Healing." *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 78:627–38.
- Beiki, Bahareh, Bahman Zeynali, Ehsan Taghiabadi, Ehsan Seyedjafari, and Mousa Kehtari. 2018. "Osteogenic Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured on WJ-Scaffold through Conventional Signalling Mechanism." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46(sup3):S1032–42.
- Chakraborty, Juhi, Subhadeep Roy, and Sourabh Ghosh. 2020. "Regulation of Decellularized Matrix Mediated Immune Response." *Biomaterials Science* 8(5):1194–1215.
- Converse, Gabriel L., Dandan Li, Eric E. Buse, Richard A. Hopkins, and Omar S. Aljitawi. 2018. "Wharton's Jelly Matrix Decellularization for Tissue Engineering Applications." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1577:25–33.
- Costa, Alessandra, Juan Diego Naranjo, Ricardo Londono, and Stephen F. Badylak. 2017. "Biologic Scaffolds." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7(9).
- Crapo, Peter M., Thomas W. Gilbert, and Stephen F. Badylak. 2011. "An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes." *Biomaterials* 32(12):3233–43.
- Cravedi, Paolo, Samira Farouk, Andrea Angeletti, Lauren Edgar, Riccardo Tamburrini, Jerome Dusuit, Laura Perin, and Giuseppe Orlando. 2017. "REGENERATIVE IMMUNOLOGY: THE IMMUNOLOGICAL REACTION TO BIOMATERIALS." *Transplant International : Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* 30(12):1199–1208.

- Cupedo, Tom, Abraham Stroock, and Mark Coles. 2012. "Application of Tissue Engineering to the Immune System: Development of Artificial Lymph Nodes." *Frontiers in Immunology* 3:343.
- Dan, Pan, Émilie Velot, Grégory Francius, Patrick Menu, and Véronique Decot. 2017.
 "Human-Derived Extracellular Matrix from Wharton's Jelly: An Untapped Substrate to Build up a Standardized and Homogeneous Coating for Vascular Engineering." Acta Biomaterialia 48:227–37.
- Davies, John E., John T. Walker, and Armand Keating. 2017. "Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells." *Stem Cells Translational Medicine* 6(7):1620–30.
- Fahmy, Mohamed. 2018. "Anatomy of the Umbilical Cord." Pp. 47–56 in *Umbilicus and Umbilical Cord*, edited by M. Fahmy. Cham: Springer International Publishing.
- Feinberg, Adam W. 2012. "Engineered Tissue Grafts: Opportunities and Challenges in Regenerative Medicine." Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine 4(2):207–20.
- Ferguson, Virginia L., and Reuben B. Dodson. 2009. "Bioengineering Aspects of the Umbilical Cord." *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 144 Suppl 1:S108-113.
- G. Jeschke, Marc, Gerd G. Gauglitz, Thang T. Phan David N. Herndon, and Katsuhiro Kita. 2011. "Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Similarities and Differences." *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal* 4(1).
- Gilbert, Thomas W., Tiffany L. Sellaro, and Stephen F. Badylak. 2006. "Decellularization of Tissues and Organs." *Biomaterials* 27(19):3675–83.
- Gogiel, Tomasz, Edward Bańkowski, and Stefan Jaworski. 2003. "Proteoglycans of Wharton's Jelly." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35(10):1461–69.
- Gupta, Ashim, Saadiq F. El-Amin, Howard J. Levy, Rebecca Sze-Tu, Sobrasua E. Ibim, and Nicola Maffulli. 2020. "Umbilical Cord-Derived Wharton's Jelly for Regenerative Medicine Applications." *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 15(1):49.
- Hunsberger, Joshua, Ola Harrysson, Rohan Shirwaiker, Binil Starly, Richard Wysk, Paul Cohen, Julie Allickson, James Yoo, and Anthony Atala. 2015. "Manufacturing Road Map for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Technologies." *Stem Cells Translational Medicine* 4(2):130–35.
- Jadalannagari, Sushma, Gabriel Converse, Christopher McFall, Eric Buse, Michael Filla, Maria T. Villar, Antonio Artigues, Adam J. Mellot, Jinxi Wang, Michael S. Detamore, Richard A. Hopkins, and Omar S. Aljitawi. 2017. "Decellularized Wharton's Jelly from Human Umbilical Cord as a Novel 3D Scaffolding Material for Tissue Engineering Applications." *PloS One* 12(2):e0172098.

- Kamal, Mohamed M., and Dina H. Kassem. 2020. "Therapeutic Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Diabetes: Achievements and Challenges." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Keane, Timothy J., and Stephen F. Badylak. 2015. "The Host Response to Allogeneic and Xenogeneic Biological Scaffold Materials." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9(5):504–11.
- Keane, Timothy J., Ricardo Londono, Neill J. Turner, and Stephen F. Badylak. 2012. "Consequences of Ineffective Decellularization of Biologic Scaffolds on the Host Response." *Biomaterials* 33(6):1771–81.
- Keane, Timothy J., Ilea T. Swinehart, and Stephen F. Badylak. 2015. "Methods of Tissue Decellularization Used for Preparation of Biologic Scaffolds and in Vivo Relevance." *Methods (San Diego, Calif.)* 84:25–34.
- Kehtari, Mousa, Bahareh Beiki, Bahman Zeynali, Fatemeh Sadat Hosseini, Fatemeh Soleimanifar, Mohammad Kaabi, Masoud Soleimani, Seyed Ehsan Enderami, Mahboubeh Kabiri, and Hossein Mahboudi. 2019. "Decellularized Wharton's Jelly Extracellular Matrix as a Promising Scaffold for Promoting Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 120(4):6683–97.
- Kobayashi, K., T. Kubota, and T. Aso. 1998. "Study on Myofibroblast Differentiation in the Stromal Cells of Wharton's Jelly: Expression and Localization of Alpha-Smooth Muscle Actin." *Early Human Development* 51(3):223–33.
- Krzyżanowski, Arkadiusz, Maciej Kwiatek, Tomasz Gęca, Aleksandra Stupak, and Anna Kwaśniewska. 2019. "Modern Ultrasonography of the Umbilical Cord: Prenatal Diagnosis of Umbilical Cord Abnormalities and Assessement of Fetal Wellbeing." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 25:3170–80.
- Langer, Robert, and Joseph Vacanti. 2016. "Advances in Tissue Engineering." *Journal of Pediatric Surgery* 51(1):8–12.
- Li, Dandan, Grace Chiu, Brea Lipe, Richard A. Hopkins, Jacquelyn Lillis, John M. Ashton, Soumen Paul, and Omar S. Aljitawi. 2019. "Decellularized Wharton Jelly Matrix: A Biomimetic Scaffold for Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Culture." *Blood Advances* 3(7):1011–26.
- Lü, Hanning, Guojiao Xu, Yuxin Gai, Li Chen, Shuyun Liu, Peng Zhao, Shibi Lu, Li Zhang, Guo Quanyi, and Jianhua Yang. 2014. "[In vitro evaluation of chondrocytes combined with Wharton's jelly of human umbilical cord oriented scaffold]."
 Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi = Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi = Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery 28(8):1017–22.
- Luis Manuel Barrios Arpi 2018. n.d. "Histology of Umbilical Cord in Mammals | IntechOpen." Retrieved May 9, 2020 (https://www.intechopen.com/books/histology/histology-of-umbilical-cord-inmammals).

- Malkowski, Andrzej, Krzysztof Sobolewski, Stefan Jaworski, and Edward Bankowski. 2007. "FGF Binding by Extracellular Matrix Components of Wharton's Jelly." *Acta Biochimica Polonica* 54(2):357–63.
- Mallis, Panagiotis, Dimitra Boulari, Panagiota Chachlaki, Catherine Stavropoulos Giokas, and Efstathios Michalopoulos. 2020. "Vitrified Wharton's Jelly Tissue as a Biomaterial for Multiple Tissue Engineering Applications." *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 36(2):139–42.
- Mallis, Panagiotis, Eleni Georgiou, Efstathios Michalopoulos, and Catherine Stavropoulos-Giokas. 2018. "Comprehensive Evaluation of Different Cryopreservation Methods Used for the Successful Storage of Human Wharton's Jelly Tissue." *Biomedical Research and Clinical Practice* 3(1).
- Mao, Angelo S., and David J. Mooney. 2015. "Regenerative Medicine: Current Therapies and Future Directions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(47):14452–59.
- Marino, Luigi, Maria Antonietta Castaldi, Rosa Rosamilio, Enrico Ragni, Rosa Vitolo, Caterina Fulgione, Salvatore Giovanni Castaldi, Bianca Serio, Rosario Bianco, Maurizio Guida, and Carmine Selleri. 2019. "Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential." *International Journal of Stem Cells* 12(2):218–26.
- Mathew et al. 2016. n.d. "(PDF) Tissue Engineering: Principles, Recent Trends and the Future: State of the Art and Recent Trends." *ResearchGate*. Retrieved April 30, 2020 (<u>https://www.researchgate.net/publication/312553713_Tissue_Engineering_Principles_Recent_Trends_and_the_Future_State_of_the_Art_and_Recent_Trends/citations</u>).
- Pelosi, Elvira, Germana Castelli, and Ugo Testa. 2012. "Human Umbilical Cord Is a Unique and Safe Source of Various Types of Stem Cells Suitable for Treatment of Hematological Diseases and for Regenerative Medicine." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 49(1):20–28.
- Penolazzi, Letizia, Michela Pozzobon, Leticia Scussel Bergamin, Stefania D'Agostino, Riccardo Francescato, Gloria Bonaccorsi, Pasquale De Bonis, Michele Cavallo, Elisabetta Lambertini, and Roberta Piva. 2020. "Extracellular Matrix From Decellularized Wharton's Jelly Improves the Behavior of Cells From Degenerated Intervertebral Disc." Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8.
- Rachakatla, Raja Shekar, and Deryl Troyer. 2009. "Wharton's Jelly Stromal Cells as Potential Delivery Vehicles for Cancer Therapeutics." *Future Oncology (London, England)* 5(8):1237–44.
- Romanowicz, Lech, and Edward Bańkowski. 2010. "Altered Sphingolipid Composition in Wharton's Jelly of Pre-Eclamptic Newborns." *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 77(2):78–87.
- Shi, Qin, JingWei Gao, Yao Jiang, Baolan Sun, Wei Lu, Min Su, Yunzhao Xu, Xiaoqing Yang, and Yuquan Zhang. 2017. "Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Endometrial Cells." Stem Cell Research & Therapy 8(1):246.

- Sobolewski, K., E. Bańkowski, L. Chyczewski, and S. Jaworski. 1997. "Collagen and Glycosaminoglycans of Wharton's Jelly." *Biology of the Neonate* 71(1):11–21.
- Sobolewski, K., A. Małkowski, E. Bańkowski, and S. Jaworski. 2005. "Wharton's Jelly as a Reservoir of Peptide Growth Factors." *Placenta* 26(10):747–52.
- Stocco, Elena, Silvia Barbon, Daniele Dalzoppo, Silvano Lora, Leonardo Sartore, Marcella Folin, Pier Paolo Parnigotto, and Claudio Grandi. 2014. "Tailored PVA/ECM Scaffolds for Cartilage Regeneration." *BioMed Research International* 2014.
- Taghizadeh, R. R., K. J. Cetrulo, and C. L. Cetrulo. 2011. "Wharton's Jelly Stem Cells: Future Clinical Applications." *Placenta* 32 Suppl 4:S311-315.
- Troyer, Deryl L., and Mark L. Weiss. 2008. "Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26(3):591– 99.
- Vieira Paladino, Fernanda, Juliana de Moraes Rodrigues, Aline da Silva, and Anna Carla Goldberg. 2019. "The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells." *Stem Cells International* 2019:3548917.
- Witkowska-Zimny, Malgorzata, and Edyta Wrobel. 2011. "Perinatal Sources of Mesenchymal Stem Cells: Wharton's Jelly, Amnion and Chorion." *Cellular & Molecular Biology Letters* 16(3):493–514.
- Xu, Yong, Liang Duan, Yaqiang Li, Yunlang She, Junjie Zhu, Guangdong Zhou, Gening Jiang, and Yang Yang. 2020. "Nanofibrillar Decellularized Wharton's Jelly Matrix for Segmental Tracheal Repair." Advanced Functional Materials 30(14):1910067.