



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

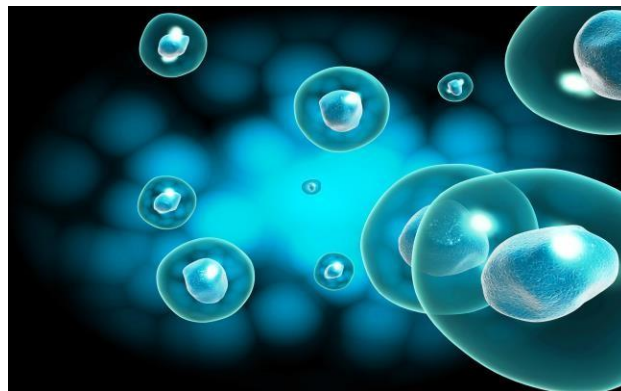


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ταυτοποίηση-Χαρακτηρισμός-Κλινικές εφαρμογές μεσεγχυματικών  
βλαστοκυττάρων (Αναδρομική Ανασκόπηση)

POST GRADUATE THESIS

Identification-Characterization-Clinical applications of mesenchymal stem cells (Retrospective study)



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

**Στεφανή Δανάη**

Stefani Danai

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Βενετίκου Μαρία**

Venetikou Maria

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2020





Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS  
**Identification-Characterization-Clinical applications of mesenchymal stem  
cells(Retrospective study)**

STEFANI DANAI

19012

[danae.stefani97@gmail.com](mailto:danae.stefani97@gmail.com)

FIRST SUPERVISOR

Venetikou Maria

SECOND SUPERVISOR

Beloukas Apostolos

THIRD SUPERVISOR

WRITE THE NAME OF THE THIRD SUPERVISOR

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.

Στεφανή Δανάη



## Ευχαριστίες

Με την παρούσα διπλωματική εργασία φτάνω στην κορύφωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο "Ταυτοποίηση- Χαρακτηρισμός- Κλινικές εφαρμογές μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Αναδρομική Ανασκόπηση)" εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της κυρίας Μαρίας Βενετίκου. Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς για την ευκαιρία που μου δόθηκε την κυρία Βενετίκου, αλλά και για τη στήριξη της, την εμπιστοσύνη της και για τη μεταλαμπάδευση των σωστών κατευθυντήριων γραμμών που μου παρείχε για τη διεξαγωγή της βιβλιογραφικής μου εργασίας. Εν συνεχεία, θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω, καθένα ξεχωριστά, όλους τους διδάσκοντες που είχα καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος για την ενεργό παρουσία τους, το πάθος τους και την μετάδοση της ποιοτικής τους γνώσης. Καταλυτικό ρόλο στη διεξαγωγή των διπλωματικών εργασιών συνετέλεσαν ο κύριος Αναστάσιος Κριεμπάρδης, Διευθυντής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος και ο κύριος Πέτρος Καρκαλούσος, καθηγητής του τμήματος και καθοδηγητής των φοιτητών στα θέματα των διπλωματικών εργασιών. Ευελπιστώ η μελλοντική ακαδημαϊκή μου πορεία να μου χαρίσει ένα εξίσου φιλικό και παραγωγικό περιβάλλον.

Είθε η παρούσα μελέτη να αποτελέσει κίνητρο των ερευνητών, για μελλοντική μελέτη μιας πιθανής συσχέτισης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

Αφιέρωσεις

Στην Αριστεά.





## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Τα στελεχαία κύτταρα ή κοινώς γνωστά ως βλαστοκύτταρα (stem cells) είναι μία κατηγορία αρχέγονων κυττάρων, δηλαδή κυττάρων που εμφανίζονται από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ενός εμβρύου, τα οποία έπειτα από αλεπάλληλες διαιρέσεις και με την επίδραση κατάλληλων σημάτων και γενετικών τροποποιήσεων, έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο του σώματος. Τα βλαστοκύτταρα είναι αδιαφοροποίητα, δηλαδή δεν εκφράζουν στην επιφάνεια τους κατάλληλες πρωτεΐνες και υποδοχείς, ώστε να έχουν εξειδικευμένες ιδιότητες και χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα **εμβρυϊκά** και τα **ενήλικα**. Τα εμβρυϊκά διαφοροποιούνται ευρύτερα αποκτώντας περαιτέρω εξειδίκευση και ονομάζονται **ολοδύναμα** και **ακόλουθα πολυδύναμα**. Παράλληλα, η διαφοροποίηση συνεχίζεται περνώντας από διάφορα στάδια, ώστε να επικρατήσει η πλήρως εξειδικευμένη μορφή κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται ως **πλειοδύναμα**, **ολιγοδύναμα** και **μονοδύναμα** και ανήκουν στην κατηγορία των ενήλικων βλαστοκυττάρων. Η ιδιαιτερότητα και ο διαχωρισμός της κάθε κατηγορίας διακρίνεται πάλι από τις εξειδικευμένες ιδιότητες που αποκτούν τα κύτταρα κατά τα στάδια της διαφοροποίησής τους. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells) είναι στελεχαία κύτταρα του στρώματος, πολυδύναμα, μη-αιμοποιητικά, με ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα και τα αδιποκύτταρα. Διακρίνονται από άλλα είδη βλαστοκυττάρων, λόγω της ιδιότητάς τους να διαφοροποιούνται σε πολύ συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, να εκφράζουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες και επιφανειακούς μάρτυρες, αλλά και της ίδιας της βιολογίας τους, που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι ιδιαιτερότητές τους και η ίδια η φυσιολογία τους, τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον αρκετά στη μελέτη των κυττάρων αυτών, ρίχνοντας φως σε πολλούς χρήσιμους μηχανισμούς και βιολογικά μονοπάτια. Στο σώμα εντοπίζονται κυρίως στον πολφό των δοντιών, στον ομφάλιο λώρο, στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα. Η συνεχιζόμενη έρευνα στα μεσεγχυματικά κύτταρα γρήγορα οδήγησε στις μέρες μας στην άμεση χρήση τους, μέσω των μεταμοσχεύσεων (είτε αυτόλογων είτε αλλογενών), για την αντιμετώπιση πληθώρας προβλημάτων υγείας. Προβλήματα που άλλοτε φάνταζαν άλυτα, σήμερα αντιμετωπίζονται καίρια και αποτελεσματικά, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα

αυτά των χονδροπαθειών, οστεοπαθειών, τραυμάτων και αυτοάνοσων ασθενειών. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα αδιαμφισβήτητα έχουν θεραπεύσει πολύ αποτελεσματικά περιπτώσεις ασθενών, που υπό άλλες συνθήκες ίσως να παρέμεναν με κάποια μόνιμη βλάβη, ωστόσο από τη χρήση τους έχουν προκύψει διάφορα βιοηθικά διλήμματα και τελικά νομοθετικά ελλείμματα, τα οποία οφείλουν να διαμορφωθούν σωστά.

**Σκοπός:** Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ταυτοποίηση, ο χαρακτηρισμός και οι κλινικές εφαρμογές των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μία αναδρομική ανασκόπηση, αλλά και οι μελλοντικές προοπτικές χρήσης αυτών.

**Μέθοδος:** Πρόκειται για βιβλιογραφική ανασκόπηση. Τα δεδομένα προέρχονται από δημοσιεύσεις επιστημονικών ομάδων, τόσο από την Ελλάδα, όσο και από το εξωτερικό, σε αναγνωρισμένες επιστημονικές βάσεις δεδομένων.

**Συμπεράσματα:** Τα συμπεράσματα είναι λιτά και περιγράφουν με λίγες φράσεις τι προκύπτει από τα αποτελέσματα της εργασίας σας.

**Λέξεις- κλειδιά:** Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs), Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, (iPSCs) Επαγόμενα Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, Κυτταρομετρία ροής, βλαστοκυτταρική φωλέα, καρκινικά βλαστοκύτταρα, βιοηθική, Ορθοπαιδική, Πνευμονολογία, Ιατρική, Φάρμακα



## Abstract

Stem cells are a class of cells, which appear from the early stages of development of an embryo, that after successive divisions and under the influence of appropriate signals and genetic modifications, are able to differentiate into any cell type of the body. Stem cells are undifferentiated cells, so practically sustainable surface proteins and receptors are not expressed, in order to obtain specialized properties. Two are the main categories that stem cells can be divided: the **Embryonic Stem Cell (ESC)** and the Adult stem cell. The ESCs are cells are broadly divided into **totipotent** and subsequently **multipotent**, by gaining further specialization. At the same time, differentiation continues through various stages, so that the fully specialized form of cells prevails. These cells are characterized as **pluripotent, oligopotent** and **monopotent**, and they belong to the category of adult stem cells. The specificity and separation is again distinguished by the specialized properties that cells acquire during the stages of their differentiation. **Mesenchymal stem cells (Mesenchymal Stem Cells)** are stratum corneum cells, pluripotent, non-hematopoietic, capable of self-renewal and differentiation into specific cell types, such as chondrocytes, osteocytes and adipocytes. They are distinguished from other types of stem cells, due to their ability to differentiate into very specific cell types, to express specialized proteins and surface controls, but also due to their own biology, which is of particular interest. Their properties and physiology, in recent years has turned scientific interest to the study of these cells, shedding light on many useful mechanisms and biological pathways. In the body they are found mainly in the pulp of the teeth, in the umbilical cord, in the bone marrow and in the peripheral blood. Ongoing research into mesenchymal cells has quickly led to their immediate use, through transplants (either autologous or allogeneic), to address a variety of health problems. Problems that once seemed unsolvable are now being tackled crucially and effectively, with the most typical examples being chondropathy, osteopathy, trauma and autoimmune diseases. Mesenchymal cells have undoubtedly been very effective in treating cases of patients who, under other circumstances, may have remained with some permanent damage, however, their use has resulted in various ethical dilemmas and ultimately legislative deficits, which must be properly shaped.

The purpose of this study is the identification, characterization and clinical applications of mesenchymal stem cells in a retrospective review, but also the future prospects of

their use. This is a bibliographic review. The data come from publications of scientific teams, both from Greece and abroad, in recognized scientific databases.

**Key- Words:** Embryonic Stem cells (ESCs), Mesenchymal stem cells, (iPSCs) induced Pluripotent Stem Cells, Flow cytometry, stem cell niche, Cancer stem cells, Bioethics, Orthopedics, Pneumonology, Medicine, Drugs

## Table of Contents

### Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή

#### 1.1 Προέλευση βλαστοκυττάρων- Ιστορική αναδρομή

#### 1.2 Στάδια ανάπτυξης εμβρύου

#### 1.3 Διάκριση μεταξύ εμβρυικών και ενήλικων βλαστοκυττάρων

#### 1.4 Διάκριση εμβρυικών κυττάρων ανάλογα με τη θέση εντοπισμού

1.5 Περαιτέρω διάκριση των ενήλικων βλαστοκυττάρων- «Ενήλικος φάση»

1.6 Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστοκυττάρων

1.7 Καρκινικά βλαστοκύτταρα- Ανάπτυξη όγκων

## Κεφάλαιο 2- Μεσεγχυματικά κύτταρα

2.1 Μορφολογία, Ιδιότητες και ανοσοφαινότυπος μεσεγχυματικών κυττάρων

2.2 Η Βλαστοκυτταρική φωλέα

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων

2.4 Ταυτοποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων- Κυτταρομετρία ροής

## Κεφάλαιο 3- Θεραπευτικές εφαρμογές, σύγχρονα πειράματα και βιοηθικοί προβληματισμοί

3.1 Κλινικές εφαρμογές- Το παράδειγμα της ορθοπαιδικής

3.2 Εφαρμογές των MSCs στην πνευμονολογία- Το παράδειγμα της κυστικής ίνωσης

3.3 Μεσεγχυματικά κύτταρα ως φορείς φαρμάκων για στοχευμένη  
θεραπεία

3.4 Αντίδραση μοσχεύματος- ξενιστή

3.5 Κώδικας Βιοηθικής Δεοντολογίας και νομοθεσία για τις τράπεζες  
φύλαξης βλαστοκυττάρων και χρήση τους για ερευνητικούς σκοπούς

3.6 Κανόνες βιοηθικής για χρήση των βλαστοκυττάρων και βιοηθικά  
διλήμματα

Κεφάλαιο 4- Συζήτηση

Βιβλιογραφικές αναφορές

Αναφορές εικόνων



## Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
MOODLE	Modular object oriented dynamic learning environment	Αρθρωτό αντικειμενοστραφές δυναμικό περιβάλλον εκπαίδευσης
ESCs	Embryonic Stem Cells	Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells	Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα
DCs	Dendritic cells	Δενδριτικά κύτταρα
MDSCs	Myeloid derived suppressor cells	Μυελικά κατασταλτικά κύτταρα
kDa	Kilodalton	Κιλοντάλτον (Μονάδα μέτρησης)
BMPs	Bone Morphogenic Proteins	Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο **«Ταυτοποίηση-Χαρακτηρισμός-Κλινικές εφαρμογές μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Αναδρομική Ανασκόπηση)»** έχει ως αντικείμενο την ταυτοποίηση και ιστορική αναδρομή των χρήσεων των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

Στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας γίνεται μία γενική ανασκόπηση στις κατηγορίες των βλαστοκυττάρων, αναφορά στην προέλευση, στη μορφολογία και στις ιδιότητές τους. Τα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του οργανισμού, γεγονός ιδιαίτερα εντυπωσιακό (Yamanaka, 2012). Στη συνέχεια διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους σε ενήλικα και εμβρυϊκά, ενώ τέλος κατηγοριοποιούνται γενικότερα τα βλαστοκύτταρα, ανάλογα με τις δυνατότητες διαφοροποίησής τους (Hassan Abdulrazzak, *Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues*, 2010).

Στο δεύτερο κεφάλαιο της εργασίας, γίνεται εκτεταμένη αναφορά στα μεσεγχυματικά κύτταρα, αναφορικά με τη μορφολογία, τις ιδιότητες και τον ανοσοφαινότυπο (Pozzobon, Piccoli, & De Corpi, 2012). Ως πηγή βλαστοκυττάρων ευρύτερα και ιδιαίτερα μεσεγχυματικών κυττάρων, αναφέρεται στη συνέχεια η βιολογία της *βλαστοκυτταρικής φωλέας*. Τονίζεται η σημασία του μικροπεριβάλλοντος στην κατεύθυνση διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017). Επιπλέον, γίνεται αναφορά στις συνθήκες καλλιέργειας των μεσεγχυματικών κυττάρων, αλλά και του τρόπου φύλαξής τους (VALLIER, 2010). Κλείνοντας, υπογραμμίζεται η κυτταρομετρία ροής, ως η κύρια και συντομότερη χρησιμοποιούμενη μέθοδος, για την ταυτοποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων και γίνεται αναφορά στις βασικές αρχές χρήσης της τεχνικής (Dolly Mushahary, 2018).

Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται θεραπευτικές χρήσεις των μεσεγχυματικών, με έμφαση στην ορθοπαιδική, για αναγέννηση οστών και στην κυστική ίνωση, ως πνευμονική ασθένεια. Περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις χρήσεις των μεσεγχυματικών έως σήμερα στην κλινική πράξη (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Η ευκολία

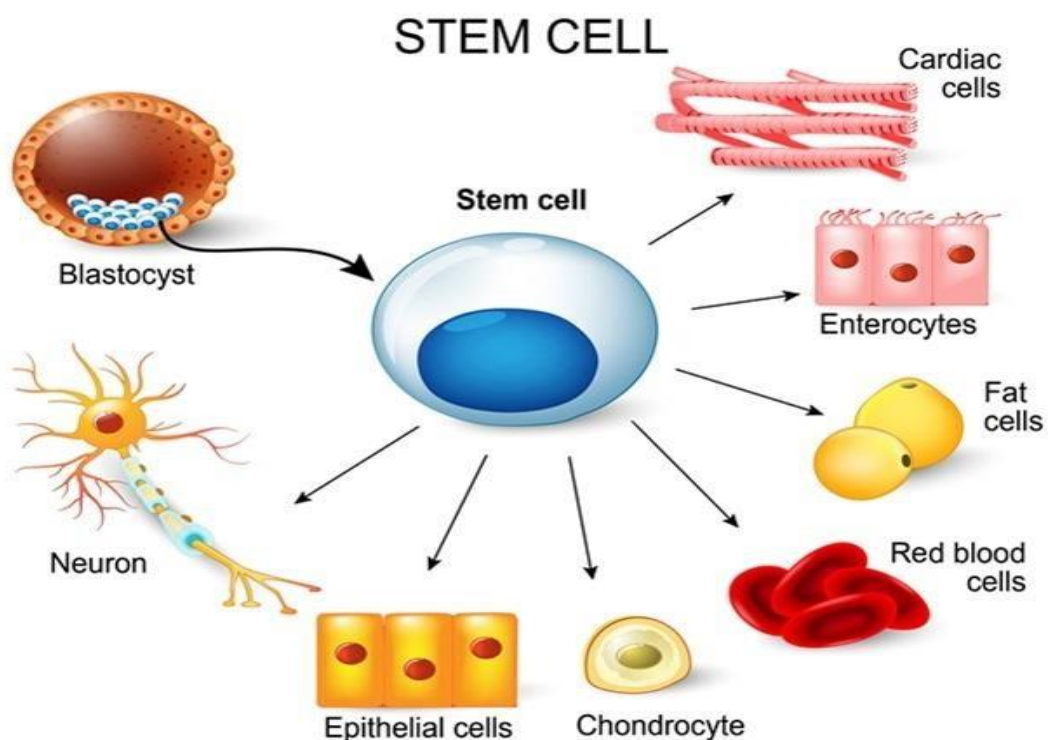
απομόνωσης τους και η *ex vivo* επέκτασή τους, τα καθιστά ελκυστικά θεραπευτικά μέσα για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Sharma, Pollock,, Hubel, & McKenna, 2014). Η πολλαπλή ισχύς των MSCs οδήγησε στην εφαρμογή τους στην αναγεννητική ιατρική και στην επισκευή ιστών (Sensebe, Krampira, Schrezenmeier, Bourin , & Giordano, 2010). Σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs μπορούν να παρέχουν θεραπευτικό όφελος μέσω της έκκρισης διαλυτών παραγόντων για την πρόκληση ανοσορρυθμιστικού περιβάλλοντος και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν σε θέσεις τραυματισμών (Wood, Issa, & Hester , 2016). Αυτή η μοναδική ιδιότητα των MSCs τα χαρακτήρισε ως φορείς παράδοσης φαρμάκων για στοχευμένη θεραπεία, γεγονός που αναλύεται εξίσου (George, Manjusha, Jegan, Mahijia, & Josphin, 2017). Στην παράγραφο αυτή, ωστόσο, αναπτύσσεται επίσης και ένα συχνό πρόβλημα που συναντάται κατά τη χρήση των MSCs, που είναι η αντίδραση μωσχεύματος- ξενιστή (Sykes, 2021). Ακόλουθα, αναλύονται κάποιοι προβληματισμοί που προκύπτουν σε βιοηθικό επίπεδο, έπειτα από τη χρήση των μεσεγχυματικών κυττάρων στην πράξη (Pozzobon, Piccoli, & De Corpi, 2012). Η κλινική εφαρμογή των βλαστικών κυττάρων αναντίρρητα συμβάλλει στην θεραπεία νοσημάτων, αλλά εγείρει και πολλά προβλήματα ηθικής και ασφάλειας (Κολιάκος, Ζουμπουρλής, & Αναστασόπουλος, 2012).

Κλείνοντας, το κεφάλαιο 4 αφιερώνεται, με σκοπό να αναπτυχθούν οι προβληματισμοί και η άποψη της συγγραφέως της παρούσας διατριβής, σχετικά με τις εφαρμογές των μεσεγχυματικών κυττάρων, αλλά και των βλαστοκυττάρων γενικότερα. Οφείλουμε να θυμόμαστε ότι η επιστήμη είναι ο σύγχρονος Ιανός- ο μυθολογικός θεός των Ρωμαίων με τα δύο πρόσωπα. Σαν αυτόν, λοιπόν, και η επιστήμη, όσο και να αναπτύσσεται, δε θα παύει να έχει δύο όψεις- την καλή και την κακή. Είναι χρέος των επιστημόνων να βλέπουν κριτικά οποιαδήποτε «πρόοδο» και καινοτομία, να θέτουν συνεχώς προβληματισμούς και να μην ξεχνάνε ότι στο λειτούργημα που ασκούν, πρωταρχική θέση έχει ο άνθρωπος και η ηθική.

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

### 1.1. Προέλευση βλαστοκυττάρων- Ιστορική αναδρομή

Τα βλαστοκύτταρα ή βλαστικά κύτταρα (stem cells) αποτελούν μία κατηγορία κυττάρων, που δεν έχουν διαφοροποιηθεί, επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και όταν διαιρούνται, σχηματίζεται κάποιο αντίγραφο του εαυτού τους και οι απόγονοί του προορίζονται για *διαφοροποίηση* (George, Manjusha, Jegan, Mahijia, & Josphin, 2017). Με τον όρο *διαφοροποίηση* αναφερόμαστε στη διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο αποκτά τα ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του, αποτέλεσμα τόσο των αλλαγών του εξωτερικού περιβάλλοντος, όσο και των αλλαγών του εσωτερικού κυτταρικού γονιδιώματος, μέσω κυρίως επιγενετικών τροποποιήσεων των γονιδίων (Begüm Aydın, 2019). Κατά αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα εξειδικεύονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του σώματος και αποκτούν ιδιαίτερη μορφολογία και ξεχωριστές ιδιότητες (MartinBergert, 2021).



**Εικόνα 1:** Τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πληθώρα κυτταρικών τύπων (Angela Betsaida B. Laguipo, 2019).

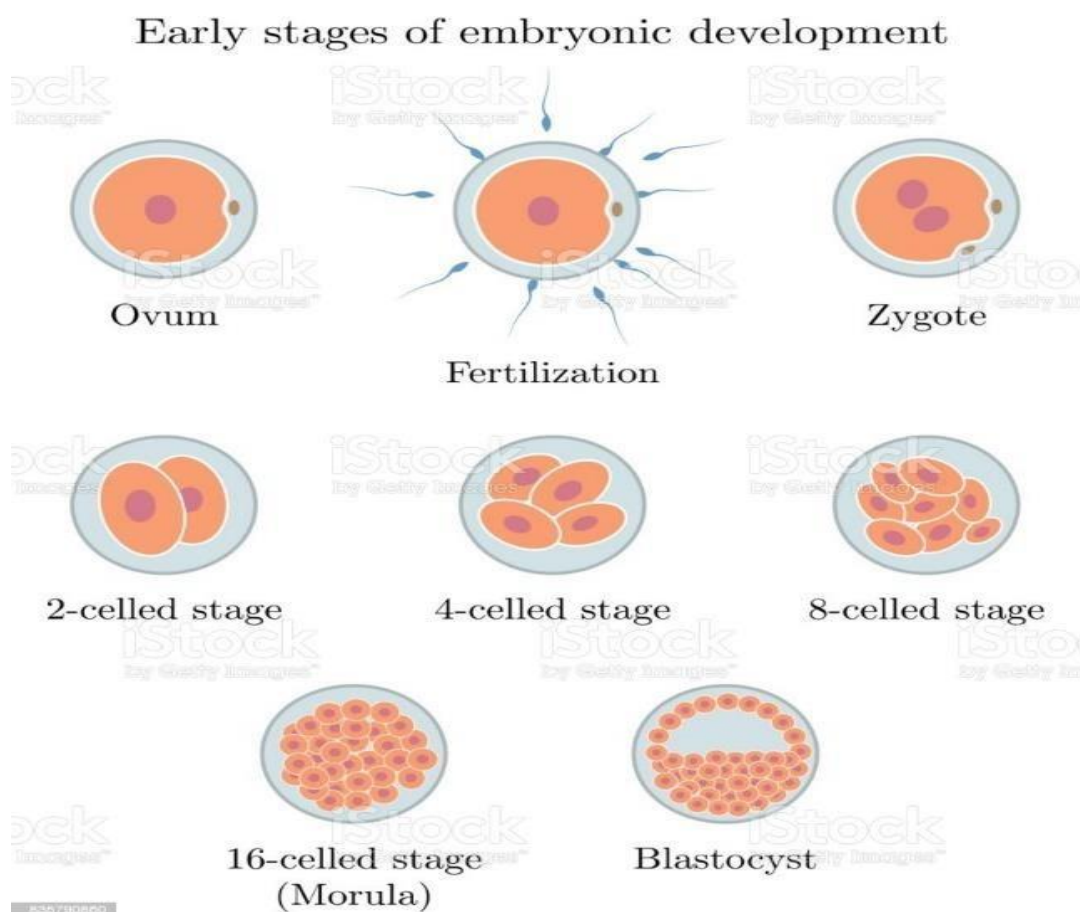
Τα βλαστοκύτταρα εμφανίζονται ήδη από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης ενός εμβρύου (Κολιάκος, Ζουμπουρλής, & Αναστασόπουλος, 2012). Η ανάπτυξη αφορά τη διαδικασία ωρίμασης ενός εμβρύου από τη στιγμή της γονιμοποίησής του, μέχρις ότου αυτό να γεννηθεί συνιστώντας έναν πλήρως λειτουργικό νεογνικό οργανισμό (MartinBergert, 2021). Η προέλευση των βλαστοκυττάρων είναι ένα μυστήριο που θα απασχολήσει για αρκετά χρόνια την επιστημονική κοινότητα. Πρώτοι ο Nakahata et al παρατήρησαν ότι στο αίμα του ομφαλίου λώρου υπάρχουν πολυδύναμα κύτταρα, που μπορούν να συμπεριφερθούν όπως τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Το 1909 σε μια επιστημονική συνάντηση στο Βερολίνο ένας βιολόγος, ο Alexander Maximo, παρουσίασε μια μελέτη για ένα κύτταρο του περιφερικού αίματος που μπορούσε να “μεταμορφωθεί” και το ονόμασε πολυδύναμο κύτταρο (Novik, 2009). Πέρασαν πολλές δεκαετίες από τότε μέχρι οι επιστήμονες να αναγνωρίσουν αυτό που σήμερα γνωρίζουμε ως το αρχέγονο κύτταρο.

Οι πρώτες μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών θα οδηγήσουν στην καλλιέργεια και ακόλουθα στο χαρακτηρισμό των βλαστοκυττάρων το 1960 (Roberto Berebichez-Fridman, 2018), ενώ το 1976 θα παρατηρηθούν τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα στο ομφαλικό αίμα και στο μυελό των οστών (R. Mafi, 2011). Μόλις 5 χρόνια αργότερα, το 1981, οι Martin et al. καλλιεργούν τα πρώτα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs), προερχόμενα από βλαστοκύστες ποντικού (Charbord, 2010). Ακόλουθα, το 1992 πραγματοποιείται καλλιέργεια βλαστοκυττάρων προερχόμενη από τη νευρική ακρολοφία και το 1997 παρατηρείται η ανάπτυξη του πρώτου καρκινικού όγκου, έπειτα από καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων (Charbord, 2010). Σταθμός στην έρευνα των βλαστοκυττάρων αποτελεί η ανακάλυψη το 2006 των iPSCs (induced Pluripotent Stem cells), δηλαδή των πολυδύναμων κυττάρων, που έχουν την ικανότητα, όταν βρεθούν σε κατάλληλο περιβάλλον, να διαφοροποιηθούν τελικά σε διάφορα κύτταρα και να δημιουργήσουν ιστούς, μία ανακάλυψη που έγινε από τον Ιάπωνα επιστήμονα Shinya Yamanaka (Yamanaka, 2012). Η έρευνα των βλαστοκυττάρων συνεχίζεται μέχρι και σήμερα και φαίνεται να αποκτά πληθώρα κλινικών εφαρμογών στις μέρες μας. Ωστόσο, προκειμένου να γίνουν καλύτερα κατανοητές η προέλευσή τους από την αναπτυξιακή διαδικασία και οι ιδιότητες διαφοροποίησής τους, είναι δόκιμο να παρατεθούν συνοπτικά τα στάδια της ανάπτυξης ενός εμβρύου.

## 1.2. Στάδια της ανάπτυξης εμβρύου

Η πρώιμη ανάπτυξη ενός εμβρύου αποτελείται από πολλά διαδοχικά στάδια, σε καθένα από τα οποία λαμβάνουν χώρα κάποια γεγονότα, που οδηγούν στην ολοκληρωτική διαμόρφωση των οργανικών συστημάτων και τελικά στην πλήρη ανάπτυξη ενός οργανισμού (Sam Behjati, 2018). Η ανάπτυξη ξεκινά αμέσως μετά από το γεγονός της *γονιμοποίησης*. Ακριβώς έπειτα από τη σύντηξη του ωαρίου με το σπερματοζωάριο, η δομή της μεμβράνης του ωαρίου μεταβάλλεται, προκειμένου να αποφευχθεί η *πολυσπερμία* και ενεργοποιείται το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της τριφωσφορικής ινοσιτόλης, με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου (Slack, 2009). Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου δίνει το έναυσμα για την έναρξη της 2<sup>ης</sup> μειωτικής διαίρεσης στο ωάριο (Slack, 2009). Ακολούθως οι προπυρήνες του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου συντήκονται, σχηματίζοντας ένα διπλοειδή πυρήνα (Slack, 2009). Στο στάδιο αυτό το γονιμοποιημένο ωάριο λέγεται *ζυγωτό*. Έπειτα ξεκινούν οι *αυλακώσεις*, δηλαδή οι πρώιμες κυτταρικές διαιρέσεις του ζυγωτού που διαφέρουν από κάθε συνηθισμένη μιτωτική κυτταρική διαίρεση, καθώς απουσιάζει η φάση της ανάπτυξης μεταξύ των διαδοχικών διαιρέσεων. Στη φάση αυτή προκύπτουν κύτταρα γνωστά ως *βλαστομερίδια*, τα οποία έχουν το μισό μέγεθος από το μητρικό κύτταρο (Slack, 2009). Κατά τη φάση της αυλάκωσης σχηματίζεται μία κοιλότητα στο κέντρο, η οποία διογκώνεται με πρόσληψη νερού, σχηματίζοντας μία δομή που ονομάζεται *βλαστόκοιλο* (Gilbert, 2017). Στο στάδιο αυτό το έμβρυο ονομάζεται *βλαστόδερμα ή βλαστίδιο* (Slack, 2009). Μετά το σχηματισμό του βλαστιδίου, το έμβρυο προχωρά σε μια φάση κυτταρικών μεταναστεύσεων και μετακινήσεων των ιστών, που ονομάζεται *γαστριδίωση* (Slack, 2009). Κατά τη φάση αυτή το έμβρυο μετατρέπεται σε μία δομή, που ονομάζεται *γαστρίδιο*, και η οποία αποτελείται από τρεις διακριτές στιβάδες. (Gilbert, 2017). Οι τρεις στιβάδες που σχηματίζονται ονομάζονται *βλαστικές στιβάδες* (Gilbert, 2017). Η εξωτερική στιβάδα είναι το *εξώδερμα*, από το οποίο στη συνέχεια θα προκύψει το δέρμα και το νευρικό σύστημα. Η ενδιάμεση στιβάδα είναι το *μεσόδερμα*, από το οποίο θα σχηματιστούν οι μύες, ο συνδετικός ιστός, τα εκκριτικά όργανα και οι γονάδες (Slack, 2009). Τέλος, από την εσωτερική στιβάδα, το *ενδόδερμα*, θα αναπτυχθούν επιθηλιακοί ιστοί του εντέρου και τα εσωτερικά όργανα (Slack, 2009). Ύστερα από το στάδιο της γαστριδίωσης, δηλαδή των κύριων μορφογενετικών κινήσεων, το έμβρυο συνήθως έχει φτάσει στο στάδιο που έχει

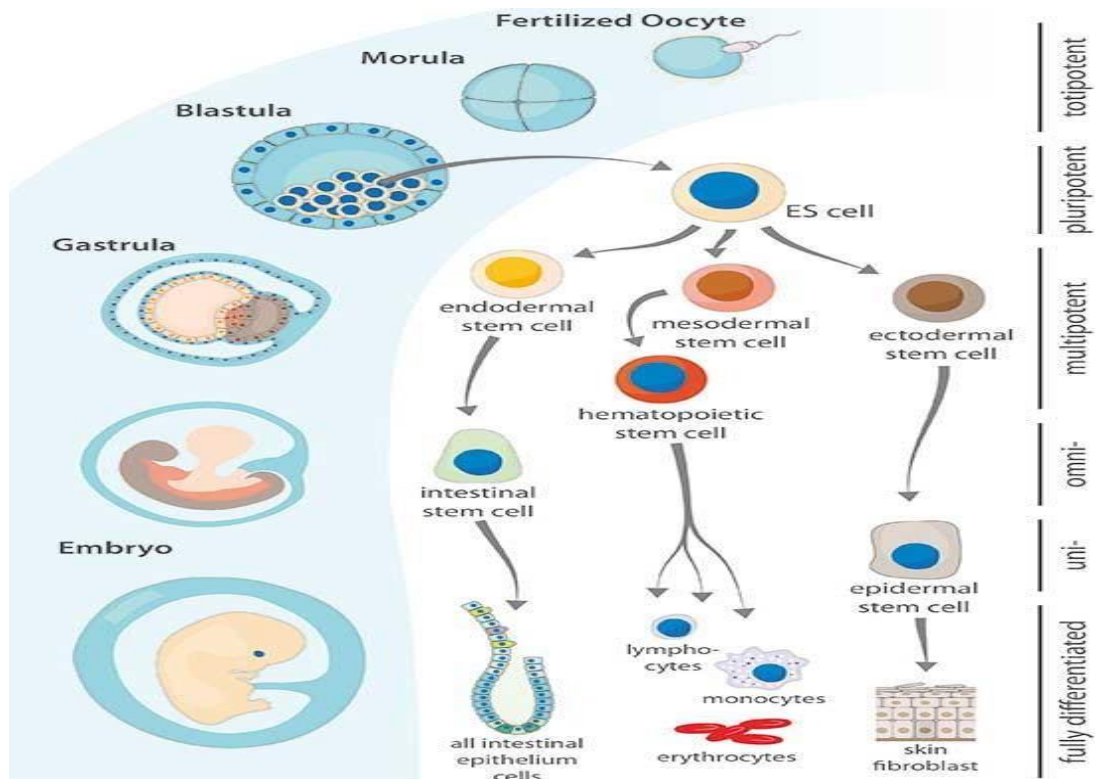
οργανωθεί το γενικό πρότυπο του σώματος (Gilbert, 2017). Στο στάδιο αυτό, κάθε κύριο τμήμα του σώματος αποτελείται από μια περιοχή δεσμευμένων κυττάρων, τα οποία δεν έχουν ακόμη διαφοροποιηθεί. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται *Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs)* (Gilbert, 2017). Ακολουθούν διαδοχικές διαιρέσεις και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, έπειτα από την επίδραση των κατάλληλων ενδοκυτταρικών παραγόντων και εξωκυτταρικών σημάτων, και οδηγούμαστε από τη φάση του ζυγωτού, στο έμβρυο και τελικά στον πλήρως ανεπτυγμένο οργανισμό (Gilbert, 2017).



**Εικόνα 2:** Συνοπτική απεικόνιση των βασικότερων σταδίων ανάπτυξης από το ωάριο μέχρι το σχηματισμό της βλαστοκύστης (iStock by Getty images, 2017).

### 1.3. Διάκριση μεταξύ εμβρυικών και ενήλικων βλαστοκυττάρων

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs) είναι αρχέγονα, αδιαφοροποίητα κύτταρα, που δημιουργούνται μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου και προέρχονται από τη βλαστικήμάζα των κυττάρων της βλαστοκύστης (Atindriya Biswas 1, 2007). Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα χωρίζονται σε δύο περαιτέρω κατηγορίες, ανάλογα με τις ιδιότητες που έχουν αποκτήσει και το στάδιο διαφοροποίησης που βρίσκονται: α) *Ολοδύναμα* και β) *Πολυδύναμα* (Tandis Vaziri, 2010). Τα **Ολοδύναμα** εμβρυικά κύτταρα (Totipotent) είναι τα αρχικά κύτταρα, που προκύπτουν από τις πρώτες διαιρέσεις, μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου, περίπου μέχρι την **4<sup>η</sup> μέρα** της ανάπτυξης (Δεληγεώργη-Πολίτη, 2013). Αυτή η κατηγορία κυττάρων μπορεί να διαφοροποιηθεί σε οποιοδήποτε κύτταρο του σώματος και να δημιουργήσει έναν πλήρως λειτουργικό ζώντα οργανισμό. Τα **Πολυδύναμα** βλαστοκύτταρα (Pluripotent) προέρχονται από το έμβρυο, όταν είναι **5-7 ημερών** και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων του σώματος (Δεληγεώργη-Πολίτη, 2013).



**Εικόνα 3:** Πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων από εμβρυικά σε πλήρως λειτουργικά και ώριμα κύτταρα (Ροή, 2019).



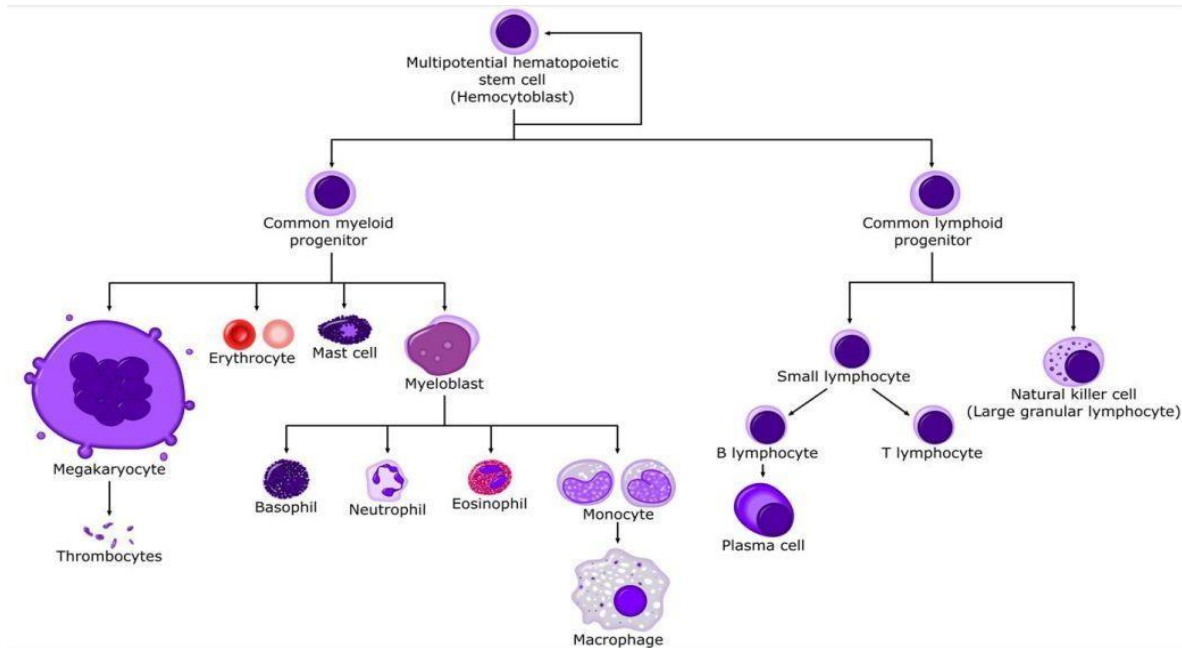
Η Πολυδυναμία των εμβρυικών βλαστοκυττάρων μειώνεται σταδιακά, καθώς συμπληρώνεται και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του εμβρύου (Gilbert, 2017). Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι δυνατόν να βρεθούν και εντός του αμνιακού υγρού (Slack, 2009). Σημειώνεται ότι τα εμβρυικά κύτταρα γενικότερα έχουν πολύ υψηλό δυναμικό διαφοροποίησης, καθώς προέρχονται από αυτά όλοι οι κυτταρικοί τύποι του σώματος. Επιπρόσθετα, φαίνεται να εμφανίζουν το πλεονέκτημα της δυνατότητας καλλιέργειας μεγάλου αριθμού αυτών των κυττάρων *in vitro*, ωστόσο μπορεί να προκληθεί απόρριψη του μοσχεύματος σε περίπτωση που μεταμοσχευθούν αλλογενώς, όπως θα συζητηθεί και σε επόμενη παράγραφο (Ρουμπελάκη, 2020)(βλ. Παράγραφο 3.4).

Μέχρι τη δεκαετία του 1960 λίγα ήταν γνωστά σχετικά με τα βλαστικά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι το 1960 ο Ernest McCulloch και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ακόμη ένα είδος βλαστικών κυττάρων, με χαρακτηριστικά και ιδιότητες, που διαφοροποιούνταν σε σχέση με τα εμβρυικά κύτταρα (ESCs) (Iscove, 2011). Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν *ενήλικα βλαστικά κύτταρα* (Iscove, 2011) (Ferreira, 2014). Πρόκειται για αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία συντάσσονται ανάμεσα σε διαφοροποιημένους ιστούς ή σε κάποιο όργανο (Ferreira, 2014). Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα βρίσκονται σε διάφορους ιστούς, με κύριο εντοπισμό τους στο μυελό των οστών, στο δέρμα, στην καρδιά, στον εγκέφαλο, στον πολφό των δοντιών, αλλά και σε άλλα μέρη και συμβάλλουν στην αναγέννηση των ιστών, στην ανάπτυξη, επούλωση και αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν υποστεί κακώσεις, καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Η επιστημονική κοινότητα αποδέχεται και τον όρο *σωματικά κύτταρα*, προκειμένου να περιγραφεί η παραπάνω κατηγορία βλαστοκυττάρων (Ferreira, 2014). Αυτή η ονοματοδοσία πραγματοποιείται και για λόγους ευκολίας, καθώς διακρίνονται τα σωματικά από τα ενήλικα βλαστοκύτταρα, τα οποία αποτελούν τα κύτταρα που έχουν προχωρήσει σε επόμενα στάδια διαφοροποίησης από τα πολυδύναμα.

Ιστορικά φαίνεται ότι η πρώτη αναφορά, που πιθανότατα αφορά στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (σωματικά), προέρχεται από τον Αισχύλο (525- 456 π.Χ.), τραγικόποιητή της αρχαίας Αθήνας στο έργο του «Προμηθέας Δεσμώτης». Στο έργο αυτό διηγείται την τιμωρία του Προμηθέα, όπου δεμένος σε ένα βράχο οι γύπες του έτρωναν το ήπαρ καθημερινά, ωστόσο αυτό κάθε βράδυ αναγεννιόταν. Το αναπάντητο ερώτημα

που φυσικά γεννάνται είναι αν ήξερε ο Αισχύλος για τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Δεληγεώργη-Πολίτη, 2013)!

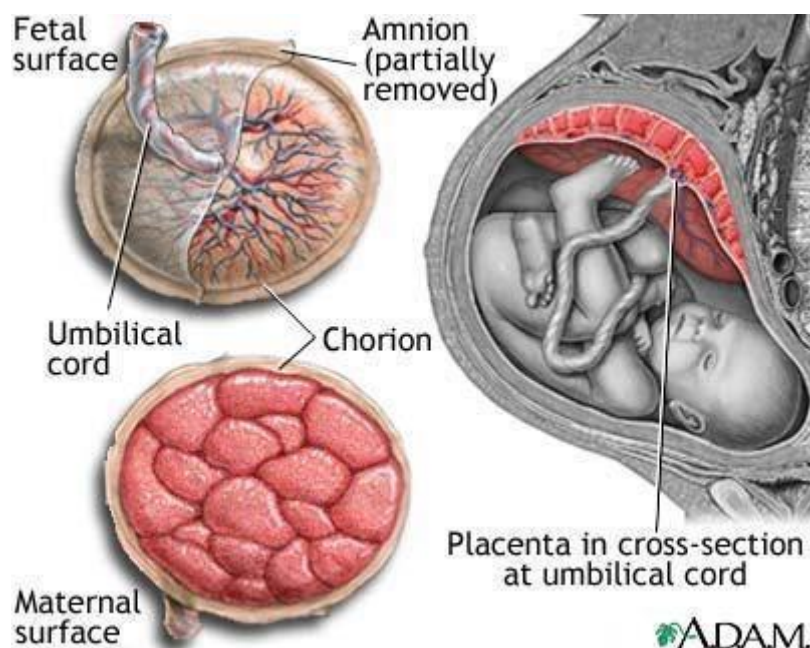
Τα βλαστοκύτταρα, χωρίζονται επίσης σε **αιμοποιητικά** και **μη αιμοποιητικά ή μεσεγγυματικά** (Albertus W. Wognum, 2015). Τα **αιμοποιητικά κύτταρα** προέρχονται κυρίως από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, δηλαδή το αίμα που κυκλοφορεί στο πλακούντα μέσω του ομφάλιου λώρου στο έμβρυο (Pauline Damien, 2015). Κατά τη γέννηση το αίμα που παραμένει στον ομφάλιο λώρο και τον πλακούντα είναι πλούσιο σε βλαστοκύτταρα (Pauline Damien, 2015). Τα αιμοποιητικά αυτά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται στα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή κύτταρα της λεμφικής (π.χ. Τ-λεμφοκύτταρα) και κύτταρα της μυελικής σειράς (όπως τα αιμοπετάλια) (Albertus W. Wognum, 2015). Κατά τη διάρκεια της ζωής τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών. Τα κύτταρα που προέρχονται από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα απομονώνονται ανώδυνα και ακίνδυνα, είναι καλύτερα ποιοτικά, καθώς δεν έχουν υποστεί μεταλλάξεις με προέλευση από το περιβάλλον, ούτε έχουν μπει σε διαδικασίες γήρανσης (Toshio Heike, 2014). Ωστόσο, εξίσου εύκολα μπορούν να απομονωθούν κυρίως από το μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα κατά την ενήλικη ζωή και να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, καθώς φαίνεται ότι με την επίδραση κατάλληλων παραγόντων και στο απαραίτητο μικροπεριβάλλον αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε αιμοποιητικό κυτταρικό τύπο (Wai Feng Lim, 2013).



**Εικόνα 4α:** Διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων/ Αιμοποίηση (Laboratoryhub, 2018)

#### **1.4 Διάκριση εμβρυικών κυττάρων ανάλογα με τη θέση εντοπισμού**

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα ανάλογα με τη θέση στην οποία εντοπίζονται διακρίνονται επιπλέον σε **αμνιακά κύτταρα** και **κύτταρα του ομφάλιου λώρου**. Η εκάστοτε ανατομική θέση που εντοπίζονται τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζεται από διαφορετικές συνθήκες μικροπεριβάλλοντος. Επόμενο είναι το συμπέρασμα ότι, λόγω του διαφοροποιημένου μικροπεριβάλλοντος που επικρατεί, τα ληφθέντα σήματα των κυττάρων διαφοροποιούνται εξίσου, όπως και τελικά οι ιδιότητές τους. Αναφορικά, τα **αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα (Amniotic Epithelial Cells- AECs)** προέρχονται από την αμνιακή μεμβράνη του ανθρώπινου πλακούντα.



**Εικόνα 4B:** Τα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από την αμνιακή μεμβράνη του πλακούντα.

Τα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν δείκτες όμοιους με αυτούς των πολυδύναμων εμβρυικών βλαστοκυττάρων (ESCs), όπως ο *Nanog*, *Sonic*, *Oct-4* και αλκαλική φωσφατάση.

Τα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* δύνανται να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, όπως για παράδειγμα σε ηπατοκύτταρα (ενδόδερμα), καρδιομυοκύτταρα (μεσόδερμα) και νευρικά κύτταρα (εξώδερμα). Τα αμνιακά βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δεν εκφράζουν ενδομοριακά τελομεράσες, επομένως δεν γηράσκουν. Συνεπώς, δε σχηματίζουν τερατώματα μετά από μεταμόσχευση *in vivo* (Toshio Miki, 2009).

Τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το επιθήλιο του ομφάλιου λώρου αποτελούν μία ξεχωριστή κατηγορία εμβρυονικών κυττάρων, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Το επιθήλιο του ομφάλιου λώρου προέρχεται από την επιθηλιακή αμνιακή μεμβράνη και φαίνεται να αποτελεί εναλλακτική πηγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων. Πληθώρα επιστημονικών μελετών έχουν αποδείξει ότι τα κύτταρα του επιθηλίου του ομφάλιου λώρου δύνανται να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά προγονικά

κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών, δενδριτικών και νευρικών προγονικών κυττάρων. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα προερχόμενο από ένα νεογνό περιλαμβάνει κυρίως έναν χαρακτηριστικό προγονικό υποπληθυσμό CD34 θετικών επιφανειακών μαρτύρων (Rogers, 2014). Περιλαμβάνουν επίσης, έναν πιο αρχέγονο υποπληθυσμό μεσεγχυματικών κυττάρων συγκριτικά με το μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προγονικά κύτταρα με δείκτες διαφοροποίησης οστών, λίπους και νευρικών κυττάρων. Φυσικά, η διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες επίδρασης του βέλτιστου μικροπεριβάλλοντος (Horecka, 2014).

### **1.5 Περαιτέρω διάκριση των βλαστοκυττάρων- «Ενήλικος φάση»**

Εκτός από τη διάκριση των βλαστοκυττάρων σε αιμοποιητικά και μεσεγχυματικά, μπορούμε περαιτέρω και να τα διακρίνουμε ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησής τους (Albertus W. Wognum, 2015). Οι συγκεκριμένες κατηγορίες, που αναφέρονται αφορούν σε αυτό το είδος κυττάρων, το οποίο παραπάνω χαρακτηρίστηκε ως ενήλικο βλαστοκύτταρο. Αυτά διακρίνονται σε *Πλειοδύναμα (Multipotent)*, *Ολιγοδύναμα (Oligopotent)* και *Μονοδύναμα (Unipotent)* (Hassan Abdulrazzak, Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues, 2010).

Τα Πλειοδύναμα (Multipotent) βλαστοκύτταρα βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα του σώματος, όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το αίμα, τα αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα και οι σκελετικοί μύες και έχουν ως κύριο ρόλο τους τη συμβολή στην αναγέννηση των ιστών (Katrin E Hostettler, 2017). Εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης, καθώς όταν διαιρείται ένα τέτοιο βλαστοκύτταρο σε δύο άλλα κύτταρα, το ένα κύτταρο θα παραμείνει ως βλαστοκύτταρο και το άλλο θα διαφοροποιηθεί περαιτέρω, για να αναγεννήσει μέρος του ιστού που έχει καταστραφεί (Katrin E Hostettler, 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα των πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων αποτελούν τα αιμοποιητικά κύτταρα, που σχηματίζουν τα κύτταρα του αίματος και βρίσκονται στο μυελό των οστών. Το είδος αυτό των κυττάρων είναι υπεύθυνο για τη συνεχή αναπλήρωση

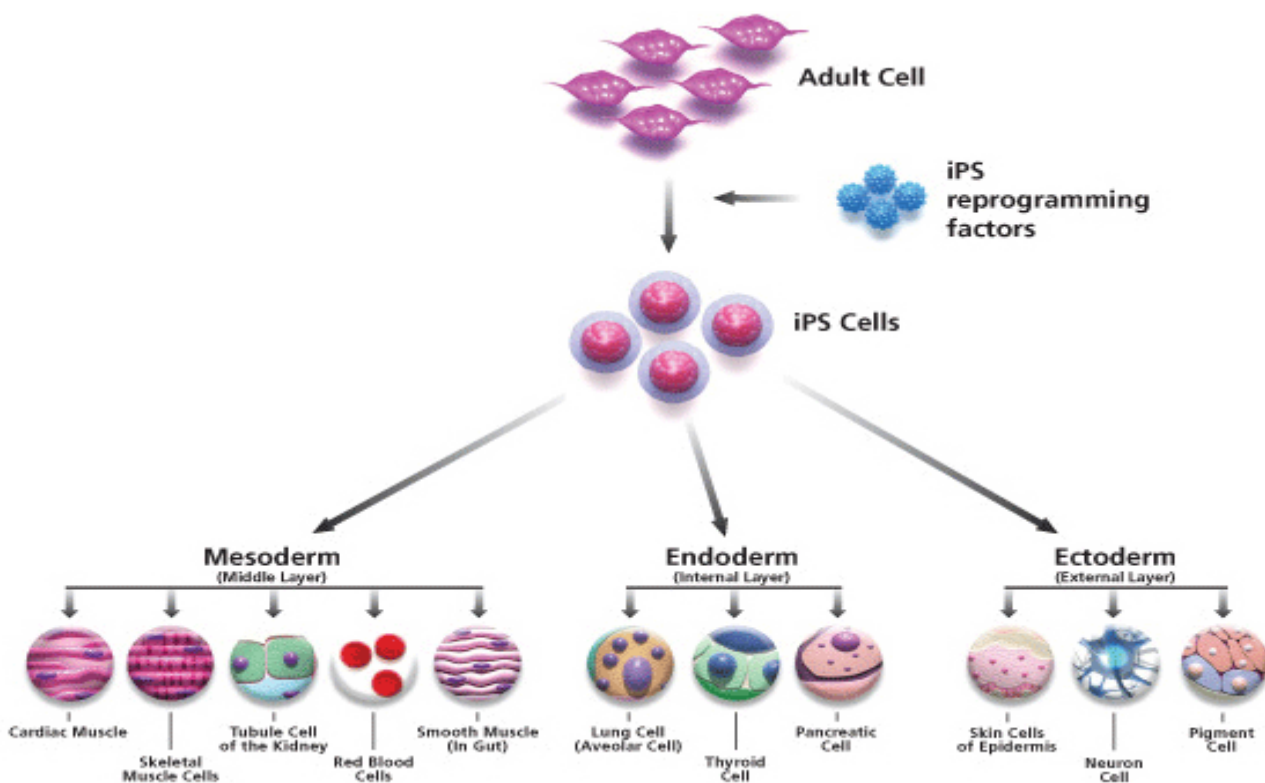
των κυττάρων του αίματος και σε περιπτώσεις λευχαιμίας είναι αυτά τα βλαστοκύτταρα, που αντικαθιστούν τα βλαβερά λευχαιμικά κύτταρα, αφού προηγηθεί επιτυχής μεταμόσχευση του μυελού των οστών (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Χαρακτηριστικές πηγές πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων είναι ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, ο πολφός των δοντιών και ο ομφάλιος λώρος, από τον οποίο κατά τη γέννηση του νεογνού συλλέγονται ομφαλοπλακουντιακά και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Η συλλογή εμβρυικών βλαστοκυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, προερχόμενα από αμβλώσεις ή τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι κάποια από τα ηθικά διλήμματα, που έρχεται να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα και τα οποία θα αναλυθούν εκτενέστερα στο τρίτο κεφάλαιο.

Τα Ολιγοδύναμα (Oligopotent) βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζονται σε αρκετά περιορισμένο αριθμό κυτταρικών τύπων, για παράδειγμα μόνο των κυττάρων της μυελικής σειράς, όπως είναι τα πολυμορφοπύρρηνα, ή της λεμφικής σειράς, όπως τα T και B λεμφοκύτταρα (George Kolios, 2012). Τα ολιγοδύναμα κύτταρα είναι γνωστό ότι είναι λιγότερο ισχυρά συγκριτικά με τα πολυδύναμα, όσον αφορά στην ικανότητα διαφοροποίησής τους (George Kolios, 2012). Τέλος, τα Μονοδύναμα κύτταρα (Monopotent) είναι τα βλαστοκύτταρα που δύνανται να διαφοροποιηθούν μόνο σε έναν κυτταρικό τύπο, λόγω χάρη σε επιθηλιακό κύτταρο, ή σε ενδοθηλιακό κύτταρο, ή σε οστεοβλάστες κλπ. Τα μονοδύναμα κύτταρα είναι ίσως γνωστότερα με τον όρο *βλάστες*, (π.χ. χονδροβλάστες, οστεοβλάστες, λεμφοβλάστες κλπ) (Mariusz Z Ratajczak, 2017). Πρόκειται, λοιπόν, για κύτταρα που δεν έχουν την απεριόριστη δυνατότητα διαφοροποίησης, όπως τα ολοδύναμα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, αλλά έχουν ήδη δεχτεί μηνύματα από το περιβάλλον τους, προκειμένου να προχωρήσουν σε επόμενα στάδια διαφοροποίησης (Mariusz Z Ratajczak, 2017). Επομένως, το εκάστοτε μικροπεριβάλλον θα διαμορφώσει τις «εντολές», που θα ενεργοποιήσουν ή θα αποσιωπήσουν τα κατάλληλα γονίδια στα βλαστοκύτταρα, ώστε τελικά να οδηγηθούν στην διαφοροποίηση σε έναν συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Slack, 2009).

Σταθμό στην ιστορία των βλαστοκυττάρων αποτέλεσε η ανακάλυψη των iPSCs (Induced pluripotent stem cells). Τα επαγόμενα ή αναπρογραμματιζόμενα κύτταρα

ανακαλύφθηκαν από τον Ιάπωνα βιοεπιστήμονα Shinya Yamanaka το 2006, στον οποίο απονεμήθηκε βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 2012 (Shinya Yamanaka, 2006). Τα κύτταρα αυτά έχουν ιδιαίτερες ιδιότητες, καθώς εμφανίζουν χαρακτηριστικά εμβρυικών κυττάρων, καθώς εμφανίζουν ολοδυναμικότητα. Διαθέτουν, δηλαδή, την ικανότητα ανάλογα με τα σήματα που θα δεχτούν από το εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον τους να διαφοροποιηθούν σε κάποια συγκεκριμένη κατηγορία κυτταρικού τύπου (Peter Karagiannis, 2019). Τα κύτταρα αυτά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των βιοεπιστημόνων ως μία πιθανή λύση στη χρήση των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων, χωρίς να προκαλούνται τόσα βιοηθικά διλήμματα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ESCs. Δυστυχώς, όμως, φέρουν και αυτά το μειονέκτημα, όπως και τα εμβρυικά κύτταρα, του πιθανού ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και της δημιουργίας είτε καλοήθων όγκων, είτε κακοήθων τερατωμάτων (Peter Karagiannis, 2019).

Χαρακτηριστική είναι η εφαρμογή των iPSCs στην οδοντιατρική σε πληθώρα ασθενών, τόσο για αναγέννηση των μαλακών ιστών (βλεννογόνων), όσο και οστίτη ιστού (H Xie, 2018). Για παράδειγμα, τα iPSCs χρησιμοποιούνται σε οδοντιατρικούς ασθενείς, των οποίων ο οστίτης ιστός έχει καταστραφεί από μία οξεία φλεγμονώδη κατάσταση, ο ουλώδης ιστός έχει υποχωρήσει και υπάρχει ανάγκη τοποθέτησης οδοντικού εμφυτεύματος. Τα iPSCs δύνανται, όταν εκτεθούν στο μικροπεριβάλλον οστίτη ιστού του στόματος, να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες, γεγονός που θα οδηγήσει σε οστεογένεση (Toka A Ahmed, 2020). Σημειώνεται ότι για την καλύτερη αναγέννηση του οστίτη ιστού στο στόμα, είναι αναγκαία η ανάμειξη των κυττάρων αυτών με ειδικά επεξεργασμένο μόσχευμα, αποτελούμενο από άλατα των οστών, όπως άλατα ασβεστίου, που υποβοηθούν την οστεογένεση, εξασφαλίζοντας το κατάλληλο μικροπεριβάλλον οστεογένεσης (Safa Aydin, 2019). Αντίστοιχα, τα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα χρησιμοποιούνται και για την αναγέννηση του βλεννογόνου, που έχει καταστραφεί από χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Κατά αυτόν τον τρόπο έχει διαμορφωθεί το απαραίτητο υγιές υπόστρωμα, για να τοποθετηθεί ένα εμφύτευμα, γεγονός που έχει πραγματοποιηθεί έπειτα από τη χρήση αυτής της ιδιαίτερης κατηγορίας βλαστοκυττάρων.



**Εικόνα 5:** iPCS και δυνατότητες διαφοροποίησης (Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Protocols, 2018)

Συμπερασματικά, λοιπόν, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα έχουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης συγκριτικά με τα εμβρυικά. Διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται, καθώς έχουν διαμορφωθεί ήδη τα μηνύματα από το μικροπεριβάλλον για την πορεία διαφοροποίησης του κυττάρου (Ρουμπελάκη, 2020).

Τα σωματικά βλαστοκύτταρα εμφανίζουν το φαινόμενο της *πλαστικότητας*. Ως *πλαστικότητα* ορίζεται η ικανότητα ενός ενήλικου βλαστοκυττάρου προερχόμενου από συγκεκριμένο ιστό να αποκτά το φαινότυπο ενός άλλου κυττάρου προερχόμενου από διαφορετικό ιστό ή όργανο ή και ακόμη να μεταπίπτει ανάμεσα σε μεσοδερμικές, εξωδερμικές και ενδοδερμικές κυτταρικές σειρές (Ρουμπελάκη, 2020). Επιπλέον, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό στους ιστούς και συχνά λόγω αυτού είναι δυσκολότερο να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν. Ωστόσο, εμφανίζουν



το πλεονέκτημα της αυτόλογης μεταμόσχευσης, καθώς δεν υφίσταται συνήθως αντίδραση απόρριψης του μοσχεύματος, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για τις κλινικές εφαρμογές των κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική (Ρουμπελάκη, 2020).

### **1.6. Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστοκυττάρων**

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των βλαστοκυττάρων είναι η ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η συνεχής αυτοανανέωση, ελοχεύει την ανάπτυξη καρκινικού όγκου, ενώ η επικράτηση της διαφοροποίησης θα οδηγούσε με την πάροδο του χρόνου σε εξάντληση των αποθεμάτων των βλαστοκυττάρων. Η ισορροπία που διατηρείται προέρχεται από την επίδραση πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, που δρουν τόσο ενδοκυττάρια, όσο και εξωκυττάρια (Yamashita, 2010). Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που «κατευθύνουν» τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν ή να πολλαπλασιαστούν, προέρχεται από *in vitro* πειράματα, κυρίως σε συστήματα καλλιέργειας (Lopez, 2018). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποδείχθηκε ότι τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα εμφανίζουν φυσική ροπή στη διαφοροποίηση (A.Knoblich, 2008). Η αυτοανανέωση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων επιτυγχάνεται κυρίως από την επίδραση του παράγοντα LIF (Leukaemia Inhibiting Factor) (Yamashita, Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division, 2018). Πρόκειται για έναν πρωτεϊνικό παράγοντα, ο οποίος διατηρεί τα εμβρυονικά κύτταρα σε κατάσταση αυτοανανέωσης, μέσω της ενεργοποίησης του ενδοκυττάριου μονοπατιού Wnt. Παράγοντες, όπως ο LIF, Wnt, Bone- morphogenic protein 4 (BMP-4), εξασφαλίζουν τη διατήρηση της αυτοανανέωσης των εμβρυικών κυττάρων μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών μεταγωγής του STAT3 και της β-κατενίνης, που οδηγούν στην ενεργοποίηση κατάλληλων γονιδίων- στόχων για την τελική παραμονή των κυττάρων στην κατάσταση της αυτοανανέωσης. Προκειμένου ένα βλαστικό κύτταρο να λάβει την απόφαση να αυτοανανεωθεί ή να διαφοροποιηθεί θα πρέπει να πλαισιωθεί από κατάλληλα σήματα, προερχόμενα από το ίδιο το κύτταρο ή από το μικροπεριβάλλον του, δηλαδή την βλαστοκυτταρική φωλέα (Yamashita, Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division, 2018).

Στην πραγματικότητα τα βλαστοκύτταρα έχουν να επιλέξουν μεταξύ τριών διαφορετικών ειδών διαίρεσης: 1) Της διαίρεσης αντιγραφής κατά την οποία και τα δύο κύτταρα διατηρούν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων, 2) τη διαίρεση διαφοροποίησης στην οποία και τα δύο θυγατρικά κύτταρα έχουν αρχίσει να διαφοροποιούνται προς κάποια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και τέλος 3) την ασύμμετρη διαίρεση στην οποία το ένα θυγατρικό κύτταρο διατηρεί τις ιδιότητες του βλαστικού κυττάρου και το άλλο οδηγείται προς τη διαφοροποίηση (A.Knoblich, 2008). Αυτός ο τύπος διαίρεσης παρατηρείται συχνά στις βλαστοκυτταρικές φωλέες και αποτελεί μοναδική ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων (Komarova, 2013).

Η στρατηγική της ασύμμετρης ανανέωσης που ακολουθούν τα βλαστοκύτταρα, με σκοπό να αυτοανανεώνονται κρύβει ένα βασικό μειονέκτημα. Αυτό είναι ότι καθίσταται αδύνατον να εκπτυχθεί περαιτέρω η δεξαμενή των βλαστικών κυττάρων, όπως απαιτείται τόσο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, όσο και κατά την αναγέννηση μετά από ιστική βλάβη. Γι'αυτό το λόγο η ασύμμετρη ανανέωση δεν αποτελεί το μοναδικό τρόπο αυτοανανέωσης των βλαστοκυττάρων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η συμμετρική αναγέννηση των βλαστοκυττάρων χρησιμεύει ως μοναδικό μέσο δυναμικού ελέγχου του αριθμού τους, ανάλογα με τις εκάστοτε ιστικές ανάγκες (A.Knoblich, 2008). Η ισορροπία μεταξύ των δύο στρατηγικών διαίρεσης είναι υψίστης σημασίας και ελέγχεται από αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά σήματα, ώστε να παράγεται κατάλληλος αριθμός βλαστικών και διαφοροποιημένων κυττάρων. Οποιαδήποτε ανισορροπία, δύναται να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος (Lopez, 2018).

Στην ασύμμετρη διαίρεση, όπου το ένα θυγατρικό κύτταρο διατηρεί τις ιδιότητες του βλαστικού και το άλλο οδηγείται σε διαφοροποίηση υπάρχουν δύο τύποι μηχανισμών. Ο πρώτος βασίζεται σε ασύμμετρο καταμερισμό στοιχείων που καθορίζουν την κυτταρική μοίρα, όπως είναι οι παράγοντες πολικότητας. Αυτός ο τρόπος ονομάζεται **εσωτερικός μηχανισμός ασύμμετρης διαίρεσης**. Στην περίπτωση αυτή η μόνη διαφορά μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων είναι η θέση τους στη βλαστοκυτταρική φωλέα, με αποτέλεσμα, ενώ αρχικά διαθέτουν το ίδιο αναπτυξιακό δυναμικό τελικά ακολουθούν διαφορετικούς δρόμους ανάπτυξης, λόγω έκθεσης σε διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα (A.Knoblich, 2008).

Οι συμμετρικές διαιρέσεις λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και κατά την ιστική αποκατάσταση και αναγέννηση μετά από βλάβη, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της επούλωσης των τραυμάτων (Lopez, 2018).

### **1.7. Καρκινικά βλαστοκύτταρα- Ανάπτυξη όγκων**

Στα βλαστοκύτταρα η ισορροπία μεταξύ διαφοροποίησης και αυτοανανέωσης αποτελεί την ιδιότητα- κλειδί, για τη διατήρηση της ομοιόστασης του τοπικού μικροπεριβάλλοντος των βλαστικών κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού συνολικά. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η απώλεια ελέγχου των μηχανισμών για την ιστική αποκατάσταση, δύναται να οδηγήσει σε κακοήγη εξαλλαγή. Επιστήμονες όπως ο Dvorak, ήδη από το 1987 είχαν περιγράψει τον καρκίνο ως μία κατάσταση ανισορροπίας, ως μία βλάβη που δεν έχει ιαθεί, αντικατοπτρίζοντας τη σχέση μεταξύ καρκινογένεσης και χρόνιας φλεγμονής ή καταστάσεων που χαρακτηρίζονται από υψηλή αναγεννητική δραστηριότητα (F.Dvorak, 1987). Σήμερα είναι γνωστό ότι κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ιστική αποκατάσταση και στη φλεγμονή, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου (Piotrowski, 2020). Είναι γεγονός, πως τύποι καρκίνου που εμφανίζονται σε ιστούς, τα κύτταρα των οποίων διαιρούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα, όπως είναι το αίμα, οι πνεύμονες και το επιθήλιο του δέρματος, εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα, έναντι καρκίνων σε ιστούς με κύτταρα που διαιρούνται με μικρότερη ταχύτητα, όπως τα οστά και οι νευρώνες (Piotrowski, 2020) .

Αν και οι έρευνες στις μέρες μας έχουν εστιάσει στην μοριακή βιολογία του καρκίνου, είναι γεγονός πως στη μελέτη για την εξέλιξη της νόσου, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η αναγνώριση των κυττάρων που δημιουργούν τον καρκίνο. Έχει φανεί ότι καρκινικοί όγκοι αποτελούνται από έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, όσον αφορά στο φαινότυπο και το δυναμικό τους να πολλαπλασιάζονται, ενώ μόνο ένα μικρό κυτταρικό κλάσμα έχει την ικανότητα να δημιουργεί τον όγκο, να συντηρεί την αύξησή του και να δίνει μεταστάσεις (Gilbert L. A., 2020). Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται **καρκινικά βλαστικά κύτταρα** και όπως τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς (Hout,

2020). Σύμφωνα με τη θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, οι όγκοι δε θεωρούνται απλές μονοκλωνικές προεκτάσεις μετασχηματισμένων κυττάρων, αλλά τρισδιάστατοι σύνθετοι ιστοί, στους οποίους τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται λειτουργικά ετερογενή, ως αποτέλεσμα διαφοροποίησης (Hout, 2020). Η θεώρηση αυτή έχει μείζονες προεκτάσεις για την έρευνα του καρκίνου, διότι προτείνει ότι η βιολογική σημασία των παρατηρήσεων που έχουν συλλεχθεί από καρκινικούς ιστούς θα πρέπει να κρίνεται υπό το πρίσμα της συσχέτισής τους με τον υποπληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Hout, 2020). Για παράδειγμα τα βιοχημικά μονοπάτια που είναι ενεργοποιημένα στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων μπορεί να έχουν μικρή λειτουργική σημασία στη βιολογία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ενώ βιοχημικές οδοί ενεργές σε λίγα μόνο καρκινικά κύτταρα μπορούν να παίζουν ρόλους- κλειδιά στη βιολογία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και κατ'επέκταση στη συμπεριφορά όλου του όγκου (Hout, 2020).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να προέλθουν είτε από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, είτε από προγονικά κύτταρα που έχουν αποκτήσει την ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων, μετά από συσσώρευση μεταλλαγών (Atashzar, 2020). Στην περίπτωση προέλευσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων από φυσιολογικά βλαστοκύτταρα, πραγματοποιούνται ογκογενετικές μεταλλαγές, που ρυθμίζουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους. Πιο αναλυτικά, οι μεταλλαγές αυτές μπορεί να οδηγούν σε απορρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν την εξάρτηση των βλαστικών κυττάρων από τη φωλεά εκκρίνοντας για παράδειγμα παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν κύτταρα- φωλεάς στον όγκο καταλήγοντας σε αύξηση του αριθμού των ίδιων των κυττάρων της φωλεάς ή ακόμα μπορούν να στρατολογούν κύτταρα- φωλεάς διαφορετικά από τα φυσιολογικά τα οποία τους παρέχουν συνεχή σήματα για αυτό- ανανέωση και επέκταση (Atashzar, 2020). Σε ένα διαφορετικό μοντέλο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν (κατόπιν μεταλλαγών) την ικανότητα να ενεργοποιούν μονοπάτια αυτο-ανανέωσης ανταποκρινόμενα σε σήματα που φυσιολογικά δεν ελέγχουν αυτή τη διαδικασία ή να ενεργοποιούν αυτόνομα ενδοκυττάρια μονοπάτια που διαφορετικά θα βρίσκονταν υπό τον έλεγχο της φωλεάς (Osman, 2020).

Στην περίπτωση που τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από πιο διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα οι ογκογενετικές μεταλλαγές επιτρέπουν στα κύτταρα αυτά να πολλαπλασιάζονται δίχως να εισέρχονται σε μεταμιτωτική φάση

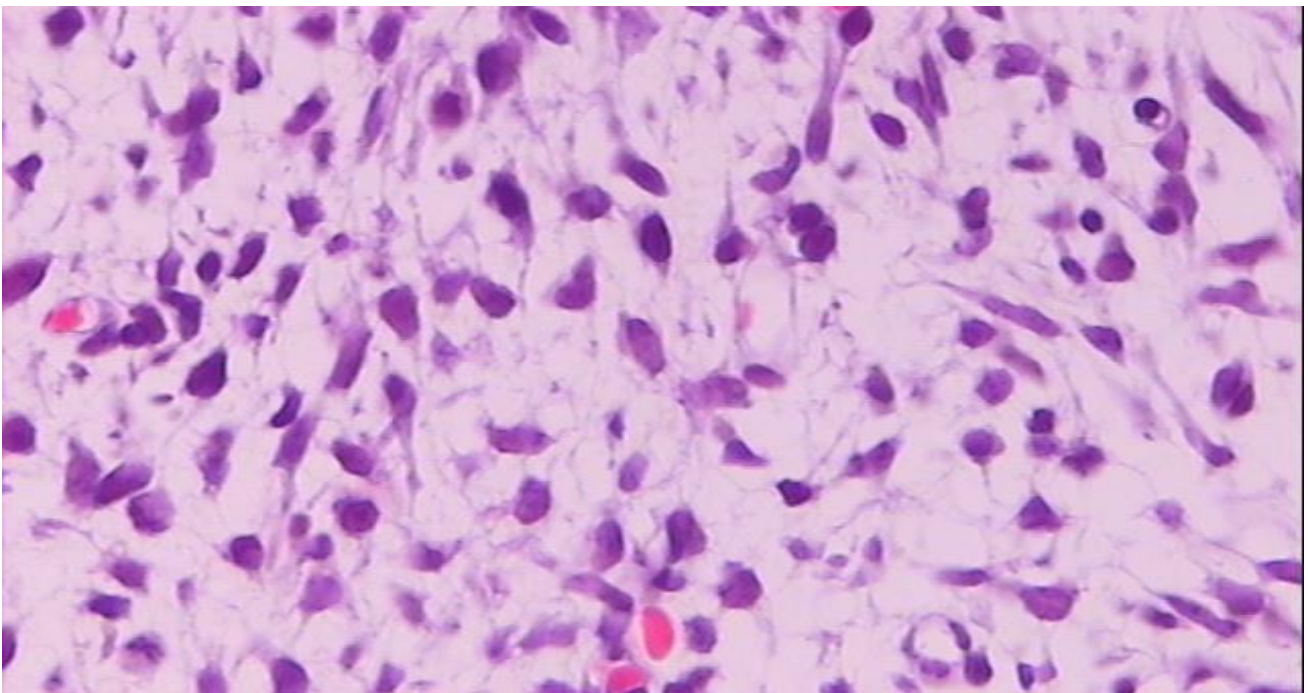
διαφοροποίησης δημιουργώντας μια δεξαμενή αυτο-ανανεούμενων κυττάρων με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων τα οποία εν συνεχεία συσσωρεύουν και άλλες μεταλλαγές και τελικά οδηγούν στο σχηματισμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα οι μεταλλαγές αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφικές ελεγκτικές αλληλουχίες που ενεργοποιούν γονίδια- κλειδιά για τη διαφοροποίηση, γονίδια που κωδικοποιούν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου ή γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση (Atashzar, 2020).

Μετά τις μεταμοσχεύσεις μεσεγχυματικών κυττάρων, με σκοπό την τελική αποκατάσταση του ιστού- στόχου, έχει παρατηρηθεί συχνά το φαινόμενο της ανάπτυξης όγκου. Για την ογκογένεση έχει ενοχοποιηθεί κατά καιρούς η συμμετρική διαίρεση των βλαστοκυττάρων. Η ενοχοποίηση αυτή έχει πραγματοποιηθεί, διότι αποδείχθηκε ότι ο μηχανισμός της ασύμμετρης διαίρεσης των βλαστοκυττάρων έχει συντηρημένο ρόλο εξελικτικά στην καταστολή των όγκων (Majumdar, 2020). Ο μηχανισμός αυτός καταστολής ρυθμίζεται με κατάλληλα γονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, ορισμένα γονίδια που συμβάλλουν στις συμμετρικές διαιρέσεις λειτουργούν και ως ογκογονίδια (Lathia, 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το γονίδιο **atypical protein kinase (aPKC)**, το οποίο όταν είναι συνεχώς ενεργοποιημένο στη *Drosophila*, προκαλεί μεγάλη αύξηση στις συμμετρικές διαιρέσεις και οδηγεί στην εμφάνιση καρκίνου. Ωστόσο, παρ'όλο που πιστεύεται ότι οι συμμετρικές διαιρέσεις δύνανται να προκαλέσουν καρκινικό όγκο, η θεωρία αυτή παραμένει ακόμη ανεξερεύνητη και υποθετική. Ίσως αν μελετηθεί καλύτερα η βιολογία των ασύμμετρων διαιρέσεων, να γίνουν πιο κατανοητοί οι μηχανισμοί που διέπουν την εμφάνιση όγκων μετά από τις μεταμοσχεύσεις και να ρίξει φως στη βιολογία του καρκίνου ευρύτερα (Majumdar, 2020).

## Κεφάλαιο 2. Μεσεγχυματικά κύτταρα

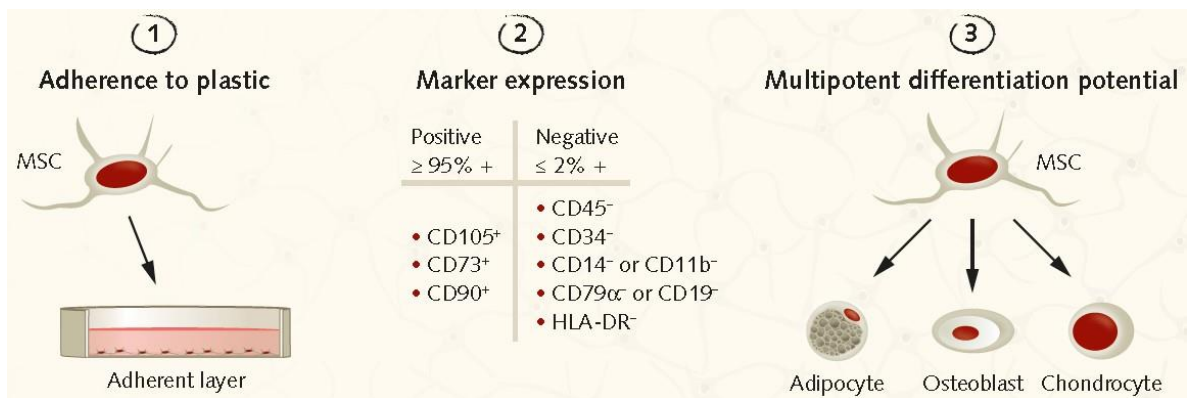
### 2.1 Μορφολογία, ιδιότητες και ανοσοφαινότυπος μεσεγχυματικών κυττάρων

Μία σημαντική κατηγορία βλαστοκυττάρων είναι τα **μη αιμοποιητικά** ή **μεσεγχυματικά κύτταρα**. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι ατρακτοειδή ή αστερόμορφα κύτταρα, με βαθυχρωματικούς πυρήνες και βρίσκονται μέσα σε χαλαρό στρώμα (Μηλιαράς, 2004). Πρόκειται για πολυδύναμα κύτταρα, που έχουν προέλευση από το μεσόδερμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν, ανάλογα με την περιοχή, δηλαδή τους παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος, σε ινοβλάστες, σε οστεοβλάστες, σε χονδροβλάστες και μυοβλάστες (Slack, 2009). Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν στην επούλωση και στην ευρύτερη ιστική ομοιόσταση (Slack, 2009).



**Εικόνα 6:** Μεσεγχυματικά κύτταρα: ατρακτόμορφα ή αστεροειδή με βαθυχρωματικούς πυρήνες και βρίσκονται μέσα σε χαλαρό στρώμα. Είναι πολυδύναμα κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν, ανάλογα με την περιοχή, σε ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, μυοβλάστες, κύτταρα του αίματος, αδιποκύτταρα κ.α. (χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση X400) (Μηλιαράς, 2004).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα διακρίνονται, λόγω του ανοσοφαινοτύπου τους από τα υπόλοιπα είδη βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να είναι θετικά για τους επιφανειακούς υποδοχείς **CD105**, **CD73**, **CD90** και όχι τους CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, HLA-DR (Jessica Cristina Marín-Llera, 2018).



**Εικόνα 7:** Επιφανειακοί μάρτυρες των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων και πολυδυναμία διαφοροποίησης (International Society for Cellular Therapy (ISCT) Guidelines on Multipotent Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Characterization, 2018).

**CD105:** Ενδογλίνη. Πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, η οποία χρησιμεύει ως βοηθητικός υποδοχέας για τη σηματοδότηση του TGF-β. Επάγει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδοθηλίου, των στρωματικών κυττάρων, των μελανοκυττάρων, καθώς και πληθώρας κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. (Farshad Nassiri, 2011)

**CD73:** 5' νουκλεοτιδάση ή 5' εξω-νουκλεάση (5'-NT). Πρόκειται για επιφανειακό ένζυμο, που εκφράζεται σε πολλαπλούς ιστούς, είναι διμερές και κάθε υπομονάδα του είναι 70kDa. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *NT5E*. Στις ενζυμικές λειτουργίες περιλαμβάνεται και η υδρόλυση του ATP και ADP στην αντιφλεγμονώδη αδενοσίνη κατά τα παρακρινικά και αυτοκρινή σήματα κινδύνου. Είναι ένας επιφανειακός μάρτυρας για τα μεσεγχυματικά κύτταρα, αλλά και για πολλά άλλα κύτταρα, όπως τα απενεργοποιημένα (CD4<sup>+</sup>) T-λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα και τα Tregs. Λόγω του CD73, αλλά και της επίδρασης άλλων παραγόντων φαίνεται ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν μία ανοσορρυθμιστική και ταυτόχρονα ανοχογόνο δράση. Η ανοσορρυθμιστική δράση φαίνεται, καθώς σε ποντίκια

knock out για το γονίδιο *NT5E* εμφανίζονταν συχνά αυτοάνοσες καταστάσεις, αλλά και προβλήματα στην ομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, αφού τα αδενοσινεργικά μονοπάτια είναι γενικότερα πολύ σημαντικά για τη διατήρηση της ομοίωσης. Οι ανοχογόνες δράσεις διακρίνονται στην περίπτωση της εμφάνισης του CD73 στους υγιείς ιστούς, όπου προστατεύεται το έμβρυο από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τέλος, το CD73 έχει περιγραφεί ότι εκφράζεται στα Tregs (T ρυθμιστικά κύτταρα), DCs (Δενδριτικά κύτταρα), MDSCs (Myeloid derived suppressor cells), δηλαδή κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Kezhe Tan, 2019).

**CD90:** ή **Thy-1.** Είναι μία πρωτεΐνη 25-37kDa βαριά γλυκοζυλιωμένη, που ανήκει στην κατηγορία των γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτολινών (GPI). Είναι μία συντηρημένη πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και των μεσεγχυματικών κυττάρων, στα οποία αποτελεί και βασικό δείκτη. Ονομάστηκε Thy-1, γιατί ανακαλύφθηκε πρώτα στα αρχέγονα θυμοκύτταρα. Η έκφραση του CD90 επεκτείνεται στους χονδροβλάστες, μυοβλάστες, στους ινοβλάστες, στα λιποκύτταρα στους οστεοβλάστες και κύτταρα προερχόμενα από το εμβρυικό ήπαρ (Ann-Kristin Picke 1, 2018). Αυτό δείχνει ότι η έκφρασή του δεν χάνεται κατά τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, που αποτελούν και τον πρόγονο σε αυτές τις κατηγορίες των κυττάρων. Αν και οι κύριες λειτουργίες της δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, φαίνεται να συμμετέχει σε διαδικασίες απόπτωσης, μετάστασης κυττάρων, αναγέννησης του νευρικού συστήματος και ίνωσης.

Είναι φανερό ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκτός από την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε συνδετικά κύτταρα (οστά, χόνδροι, αδιποκύτταρα κλπ), διακρίνονται και για τις ανοσοκατασταλτικές τους ιδιότητες και τη μειωμένη ανοσογονικότητά τους. Ιστορικά, η επιβεβαίωση ότι ο μυελός των οστών περιλαμβάνει, εκτός από πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και μη αιμοποιητικά κύτταρα, προέκυψε για πρώτη φορά από τις πρωτοποριακές μελέτες των Friedenstein et al. στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Rhiannon Nancarrow-Lei, 2017). Έπειτα από τη χρήση υγρών μυελικών καλλιιεργειών, οι ερευνητές διέκριναν μεμονωμένες αποικίες επιμήκων κυττάρων, που έμοιαζαν με ινοβλάστες, οι οποίοι, όταν μεταμοσχεύονταν, μπορούσαν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα του χόνδρου, οστίτη και ινώδους ιστού. Τα μεσεγχυματικά



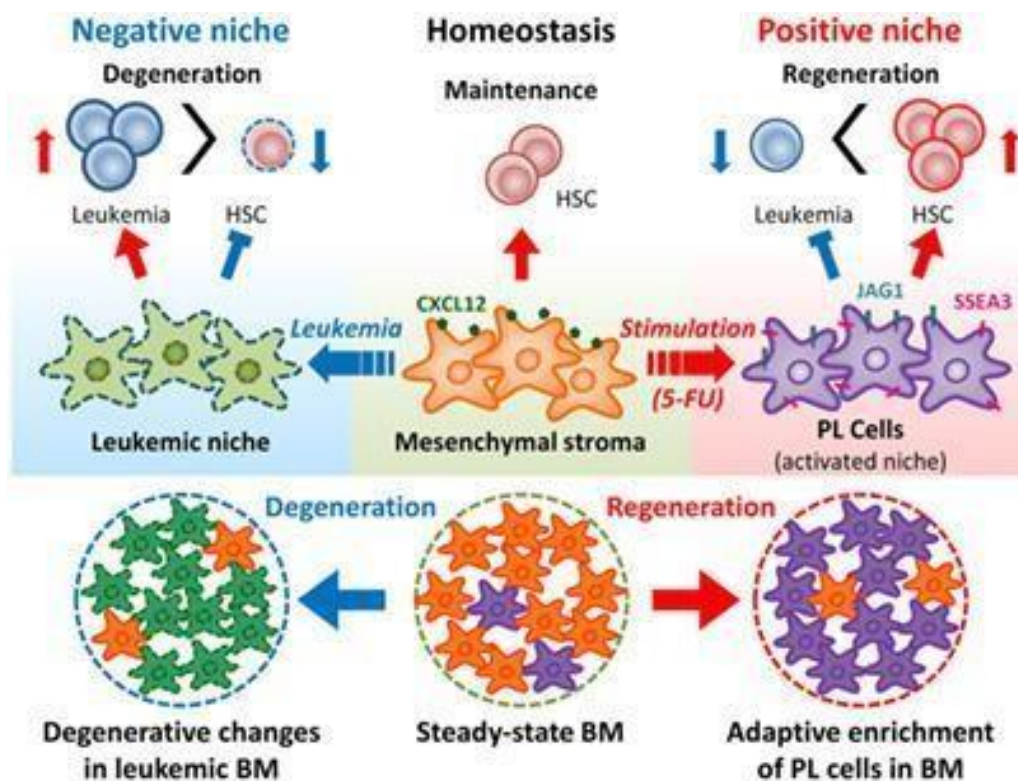
κύτταρα τοπολογικά εμφανίζονται κυρίως στο μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα και στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα και λιγότερο σε διάσπαρτους ιστούς (Rhiannon Nancarrow-Lei, 2017). Έχουν επίσης απομονωθεί από το περιόστεο, το σπλήνα, τον πνεύμονα, το ήπαρ και τον πλακούντα. Ωστόσο, δεν πρόκειται για κύτταρα με ισότιμη δυναμική, όσον αφορά στην ικανότητα διαφοροποίησής τους, λόγω της διαφορετικής θέσης εύρεσης των κυττάρων και επομένως του διαφορετικού εξωκυτταρικού μικροπεριβάλλοντος που αυτά εκτίθενται (Hassan Abdulrazzak, Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues, 2010). Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα κύτταρα είναι τα μυελικά μεσεγχυματικά και αρκετά καλή δυνατότητα διαφοροποίησης σε καλλιέργεια φαίνεται να έχουν τα κύτταρα που προέρχονται από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Sharma, Pollock,, Hubel, & McKenna, 2014).

## **2.2 Η Βλαστοκυτταρική φωλέα**

Ο μυελός των οστών διατηρεί ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον, τόσο για τα αιμοποιητικά όσο και για τα μεσεγχυματικά κύτταρα που «φιλοξενεί». Η έννοια της τοπολογίας ενός κυττάρου στο μυελό των οστών παίζει ιδιαίτερο ρόλο, αφού ουσιαστικά καθορίζει και τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος που αυτό εκτίθεται, επομένως και τη μετέπειτα πληροφορία για διαφοροποίηση και ιδιότητες (Slack, 2009). Μία «αποθήκη» βλαστοκυττάρων καλείται *φωλέα* (Stem cell niche) και είναι ένας ανατομικά προσδιορισμένος χώρος, που δεν περιορίζεται απλώς στο μυελό των οστών, αλλά φαίνεται να αναγνωρίζεται και σε άλλους ιστούς. Τοπολογικά εκεί λαμβάνει χώρα η ρύθμιση των βλαστοκυττάρων, είτε αιμοποιητικών είτε μεσεγχυματικών, ο αριθμός που θα παραχθεί, οι ιδιότητές τους και η προσαρμογή τους σε συνθήκες πίεσης ή αλλαγών του περιβάλλοντος (Youmna Kfoury, 2015). Η έννοια της βλαστοκυτταρικής φωλέας εκφράστηκε για πρώτη φορά το 1978 από τον Ray Schofield στην προσπάθειά του να οριοθετήσει το περιβάλλον των βλαστοκυττάρων. Παρόλο που στο ανθρώπινο σώμα εντοπίστηκαν φωλέες στο γαστρεντερικό σύστημα, στο δέρμα, στο μυελό των οστών, στον όρχι και στο ωάριο, δεν υπάρχουν ακόμη κατάλληλοι δείκτες για τον ευκολότερο εντοπισμό τους (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017).

Σε μία φωλέα παραμένουν αδιαφοροποίητα, λόγω της τοπογραφικής τους οργάνωσης και μορφολογίας βλαστοκύτταρα, τα οποία με τα κατάλληλα σήματα θα διαφοροποιηθούν σε όποιο κύτταρο είναι αναγκαίο στον οργανισμό (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017). Οι εκκρινόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες, γνωστοί και από αναπτυξιακά μονοπάτια που συμμετέχουν, όπως είναι οι *Wnt*, *Sonic*, *Hedgehog*, *BMPs* (Bone Morphogenic Proteins), αλλά και αυξητικοί παράγοντες, όπως οι προσταγλανδίνες E2 αλλά και ιόντα ασβεστίου, ασκούν ρυθμιστική δράση στα σωματικά βλαστοκύτταρα εντός της φωλέας, αφού διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον που ουσιαστικά έρχεται σε φυσική επαφή το εκάστοτε κύτταρο (Stephanie N Hurwitz, 2020). Περιλαμβάνει μία ομάδα κυττάρων που συνδέεται με τα βλαστοκύτταρα, μέσω μορίων προσκόλλησης (Hans Clevers, 2014). Η πολωμένη προσκόλληση των βλαστοκυττάρων με τα στηρικτικά κύτταρα της φωλέας και την εξωκυττάρια ουσία, αλλά και η ασύμμετρη ενδοκυττάρια κατανομή παραγόντων με αναπτυξιακό δυναμικό, συμβάλλει στον προσανατολισμό της διαίρεσης των βλαστοκυττάρων και τον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017).

Είναι φανερό ότι ο ρόλος της βλαστοκυτταρικής φωλέας είναι εξαιρετικά σημαντικός στη διαμόρφωση της μοίρας της διαφοροποίησης των κυττάρων. Η επιστημονική κοινότητα εστίασε στη σημασία της, όταν παρατηρήθηκε από τους Aguilera et al., ότι σε περιπτώσεις λευχαιμιών φάνηκαν να υπάρχουν ανωμαλίες τόσο δομικές, όσο και τοπολογικές στη βλαστοκυτταρική φωλέα του μυελού των οστών (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017). Επιπλέον, φάνηκε ότι πιθανά συνδέονται ανωμαλίες ανατομικές και δομικές της βλαστοκυτταρικής φωλέας, με οστεοπάθειες, συγγενείς χονδροπάθειες, γεγονός που προσιδιάζει με την ανωμαλία στη σωστή ανάπτυξη και διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων (Jirong Yang, 2019). Η επιδιόρθωση της βλαστοκυτταρικής φωλέας, κυρίως του μυελού των οστών, αποτελεί τα τελευταία χρόνια έναν αρκετά γοητευτικό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών, αναφορικά κυρίως αιματολογικών, όπως η λευχαιμία (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017).



**Εικόνα 8:** Βλαστοκυτταρική φωλέα. Στην εικόνα διαφαίνεται ο τρόπος που το μικροπεριβάλλον επιδρά, μέσω κατάλληλων παραγόντων, στη διαφοροποίηση των κυττάρων (Seon-Yeong Jeong, 2018).

### 2.3 Συνθήκες καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι απαραίτητο, αφού απομονωθούν από κάποια πηγή βλαστοκυττάρων, να καλλιεργηθούν σε κάποιο εργαστήριο, με σκοπό να πολλαπλασιαστούν. Οι συνθήκες καλλιέργειας γίνονται σε ειδικά διαμορφωμένα εργαστήρια μελέτης της αιμοποίησης, με εξειδικευμένα πρωτόκολλα. Τα κύτταρα MSCs είναι κύτταρα με ατρακτοειδές σχήμα (Μηλιαράς, 2004). Όταν πραγματοποιηθεί η συλλογή τους από το μυελό των οστών τοποθετούνται σε μία φλάσκα, όπου και ακολουθεί η φάση της προσαρμογής των κυττάρων (Lag phase) (Dolly Mushahary, 2018). Ακολούθως, αφού τα κύτταρα προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον της φλάσκας, αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται, με χρόνο διπλασιασμού, που ποικίλει ανάλογα με την ηλικία του δότη και τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που πήραμε (Dolly Mushahary, 2018).

Σημειώνεται ότι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων, μετράται συνήθως με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, τεχνική που θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο. Ακόλουθα, τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα της φλάσκας, έπειτα από την εφαρμογή κατάλληλων ενζύμων και επανακαλλιεργούνται. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται passage κι επαναλαμβάνεται διαδοχικά για 20-50 διπλασιασμούς του κυτταρικού πληθυσμού (Yueh-Hsun Kevin Yang, 2018).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα φαίνεται να διαθέτουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, αλλά και λόγω του γρήγορου πολλαπλασιασμού και της ικανότητας να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και για ιστική επιδιόρθωση. Παρ'όλα αυτά δεν έχουν αυξημένη δυνατότητα μετανάστευσης (homing), για να ισχυριζόμαστε ότι ευθύνονται αποκλειστικά για την ιστική επιδιόρθωση (Szydlak, 2018). Έτσι, υποστηρίζεται η άποψη ότι τα ευεργετικά θεραπευτικά αποτελέσματα προκύπτουν από τις παρακρινείς δράσεις των κυττάρων, μέσω έκκρισης βιοδραστικών παραγόντων, με αυξητικές, αντιφλεγμονώδεις και-ή ανοσοκατασταλτικές, αντιαποπτωτικές και αγγειογενετικές ιδιότητες (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Πριν χορηγηθεί στον ασθενή, το κυτταρικό παρασκεύασμα θα πρέπει να μην περιέχει συσσωματώματα και να μην έχει ενδείξεις μόλυνσης από κάποιο παθογόνο. Επιπλέον, τα κύτταρα κάτω από το μικροσκόπιο, θα πρέπει να έχουν ατρακτοειδές σχήμα υποχρεωτικά, να εκφράζουν σε ποσοστό 90% του δείκτες επιφανείας **CD73**, **CD90** και **CD105**, αλλά **όχι** τους δείκτες **CD34**, **CD45**, **CD14** και **CD3** (Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012). Τέλος, τα κύτταρα θα πρέπει να χορηγούνται “φρέσκα” χωρίς, δηλαδή, προηγουμένως να έχουν καταψυχθεί.

Η φύλαξη των μεσεγχυματικών κυττάρων, κυρίως από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα γίνεται σε ειδικές τράπεζες φύλαξης ομφαλικού αίματος/ βλαστοκυττάρων. Στην Ελλάδα λειτουργούν τόσο δημόσιες, μέσω των νοσοκομείων, όσο και ιδιωτικές τράπεζες (<https://www.cordbloodbankcrete.gr/index.php/roiioi-eimaste/ditov-kritis>, 2017). Αρχική μέριμνα οφείλει να είναι η καταμέτρηση των βλαστοκυττάρων, που εντοπίζονται στην εκάστοτε μονάδα, συνήθως με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, η καταγραφή του αριθμού και η φύλαξη. Η αποθήκευση της μονάδας γίνεται στη βαθιά κατάψυξη, στους -80 βαθμούς Κελσίου. Τα κύτταρα είναι αρκετά ευαίσθητα και αναμένουν ειδικής επεξεργασίας, πρωτού καταψυχθούν, προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες. Φυσικά, κατά την απόψυξη των κυττάρων, επειδή γενικότερα είναι μία επίπονη διαδικασία για τα

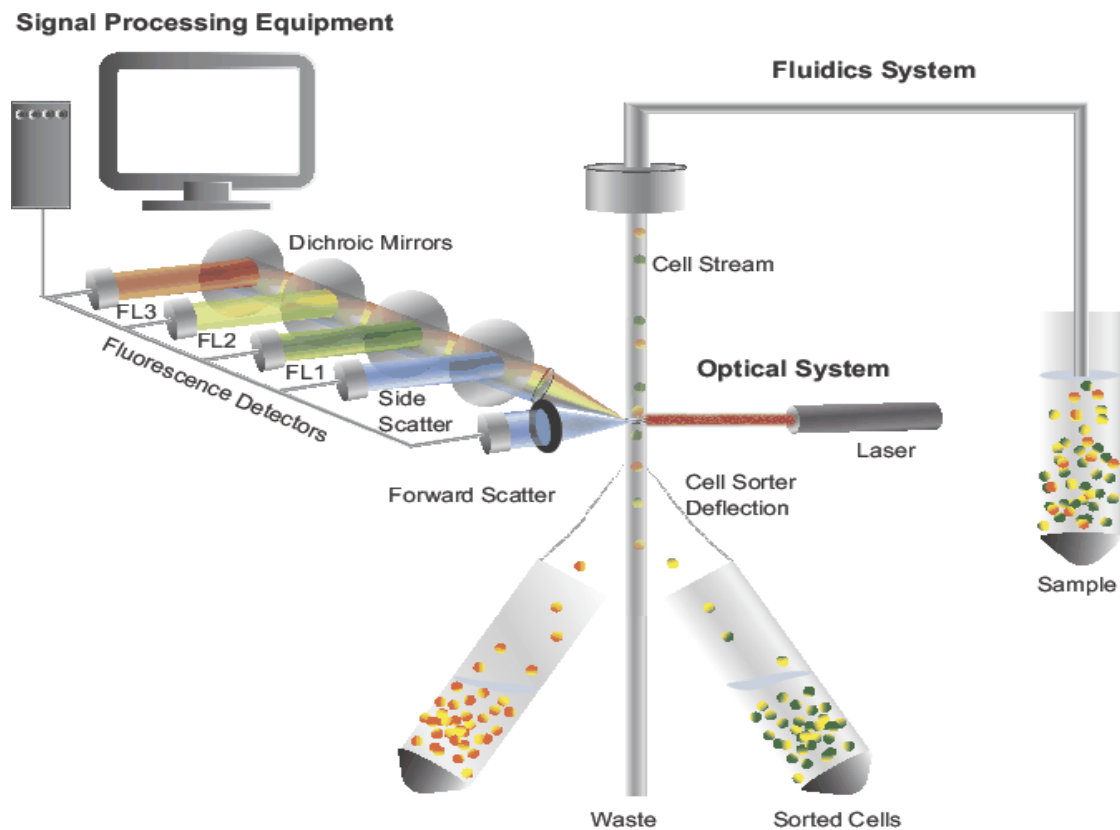
κύτταρα αυτή, αναμένονται να υπάρχουν και απώλειες, συγκριτικά με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που καταμετρήθηκαν πριν την κατάψυξη (<https://www.cordbloodbankcrete.gr/index.php/roiioi-eimaste/ditov-kritis>, 2017). Όπως θα αναλυθεί στην παράγραφο του Κεφαλαίου 3, που αναφέρεται στη βιοηθική, οι τράπεζες φύλαξης βλαστοκυττάρων υπάγονται σε συγκεκριμένη ευρωπαϊκή και ελληνική νομοθεσία.

#### **2.4 Ταυτοποίηση μεσεγγυματικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία αυτοματοποιημένη τεχνική, που συνδυάζοντας το φθορισμό και τη σκέδαση, μπορεί να ποσοτικοποιήσει κυτταρικούς πληθυσμούς, να αναλύσει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών, καθώς και να ανιχνεύσει κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε σύντομο χρονικό διάστημα (McKinnon, 2018). Χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια αιμοποίησης και σε τράπεζες φύλαξης βλαστοκυττάρων. Αποτελεί μία πολύ καλή τεχνική, προκειμένου έπειτα από την εφαρμογή κατάλληλων πρωτοκόλλων, να απαριθμηθούν πολύ σύντομα τα κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα αίματος (Betters, 2015). Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται και στη μέτρηση των μεσεγγυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, μυελό των οστών κλπ, και είτε πρέπει να φυλαχθούν, είτε να καλλιεργηθούν/επεξεργαστούν, για περαιτέρω κλινική εφαρμογή (Betters, 2015). Σημειώνεται ότι στην κυτταρομετρία ροής, κατά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων απομόνωσης των κυττάρων, με σκοπό την καταμέτρησή τους στο αρχικό δείγμα, πρέπει να είναι τα κύτταρα σε μορφή εναιωρήματος (McKinnon, 2018).

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από: το υδροδυναμικό σύστημα, την κυψελίδα ροής, μέσα από την οποία περνάει το κυτταρικό εναιώρημα περιβαλλόμενο από ένα αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα, που εξασφαλίζει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη, το οπτικό σύστημα/ ακτινοβολία Laser, τα φίλτρα που διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας, τους φωτοπολλαπλασιαστές, που συλλέγουν τα φωτεινά σήματα του φθορισμού και του σκεδαζόμενου φωτός και από ένα ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων, που μετατρέπει τα φωτεινά σήματα σε δεδομένα και τα απεικονίζει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου (McKinnon, 2018). Κατά την πρόσθια σκέδαση

(forward scatter), φανερώνεται το **μέγεθος του κάθε κυττάρου**, που διαπερνά η ακτίνα laser και κατά την πλάγια σκέδαση (side scatter), ανιχνεύεται η πολυπλοκότητα του κυττάρου, δηλαδή για παράδειγμα η **κοκκιότητα** (Betters, 2015).



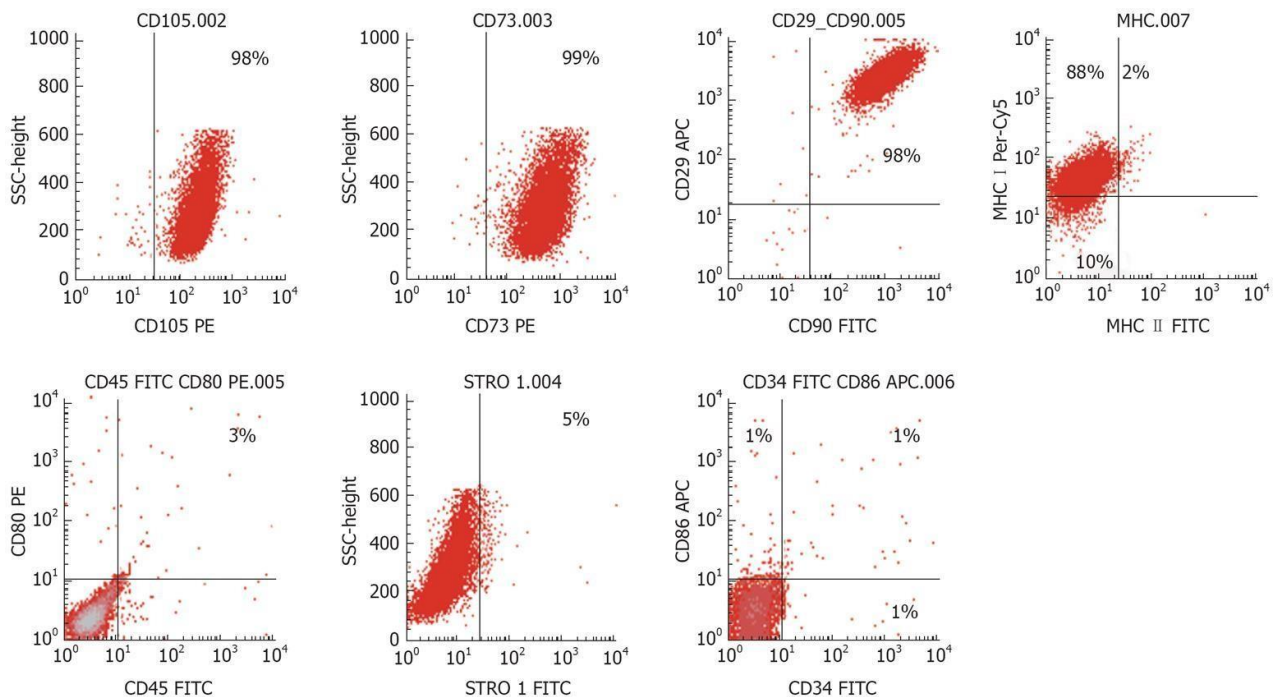
**Εικόνα 9:** Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

**Πώς όμως τα κύτταρα γίνονται ορατά με έναν κυτταρομετρητή ροής?**

Προκειμένου να γίνουν ορατά τα κύτταρα χρειαζόμαστε φθορίζουσες χρωστικές, που εκπέμπουν σε διαφορετικό χρώμα του φάσματος της ορατής ακτινοβολίας. Η κάθε φθορίζουσα χρωστική συνήθως είναι συνδεδεμένη με αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν ως αντιγονικούς επιτόπους μάρτυρες (markers) της επιφάνειας της μεμβράνης των κυττάρων, όπως μία πρωτεΐνη, έναν υποδοχέα κ.ο.κ. Οπότε είναι πολύ

σημαντικό να γνωρίζουμε από την αρχή τον επιθυμητό προς απομόνωση πληθυσμό, τις ιδιότητες και τους μάρτυρες που εκφράζονται στην επιφάνειά του, για την ευκολότερη ταυτοποίησή του (Givan, 2011). Στην περίπτωση των μεσεγχυματικών κυττάρων, γνωρίζουμε ότι εκφράζουν στην επιφάνειά τους, τους δείκτες CD73, CD90, CD105, οπότε και χρησιμοποιούνται τα αντίστοιχα αντισώματα, συνδεδεμένα με διαφορετικές χρωστικές κάθε φορά (Maxime Ducret, 2019). Οι ανοσοσφαιρίνες που συνδέονται με τους επιφανειακούς μάρτυρες των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι άμεσα ή έμμεσα συνδεδεμένες με τις φθορίζουσες χρωστικές (Alona Epshtein, 2017). Αν το αρχικό αντίσωμα δεν είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική, μία άλλη ανοσοσφαιρίνη σημασμένη με τη χρωστική, αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα και επομένως και τον επιφανειακό μάρτυρα. Το πλεονέκτημα της χρήσης ετερογενών αντισωμάτων, άμεσα συνδεδεμένων με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, είναι η ταυτόχρονη χρώση διαφορετικών επιφανειακών πρωτεϊνών στον ίδιο κυτταρικό υποπληθυσμό. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η άμεση και γρήγορη κατηγοριοποίηση των κυττάρων σε υποπληθυσμούς, ανάλογα με τους επιθυμητούς επιφανειακούς μάρτυρες (Vellasamy S, 2012).

Μία τυπική αντικατοπτριστική εικόνα από την κυτταρομετρία ροής, για τον εντοπισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι η παρακάτω:



**Εικόνα 10:** Τυπική εικόνα ταυτοποίησης MSCs με κυτταρομετρία ροής (Vellasamy S, 2012)

Στην εικόνα αυτή διαχωρίζεται ο πληθυσμός των μεσεγχυματικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως θετικούς επιφανειακούς μάρτυρες τους CD105, CD73, CD90, και τους CD34 και CD45 ως αρνητικούς μάρτυρες. Στο πρώτο διάγραμμα διαχωρίζονται τα ζωντανά κύτταρα βάσει της κοκκιοτήτάς τους και με επιφανειακό μάρτυρα το CD105 και ομοίως στο δεύτερο διάγραμμα με το μάρτυρα CD73 και το CD105. Στο τρίτο διάγραμμα διακρίνουμε κύτταρα με μάρτυρες CD105, CD73 και CD90 και CD29. Στο τέταρτο διάγραμμα διακρίνουμε τα MHC I και MHC II κύτταρα, από τα κύτταρα που έχουμε επιλέξει από το διάγραμμα 3 ότι εκφράζουν τους επιθυμητούς μάρτυρες. Στο πέμπτο διάγραμμα απομονώνονται τα κύτταρα που είναι αρνητικά για τον CD45 και στο έβδομο αρνητικά για τον CD34 μάρτυρα αντίστοιχα, ενώ στο έκτο διάγραμμα διαχωρίζονται τα κύτταρα με το μάρτυρα stro με τη χρωστική FITC. Κατά αυτό τον τρόπο υπολογίζονται μέσω κυτταρομετρίας ροής τα μεσεγχυματικά κύτταρα που υπήρχαν στο αρχικό δείγμα.



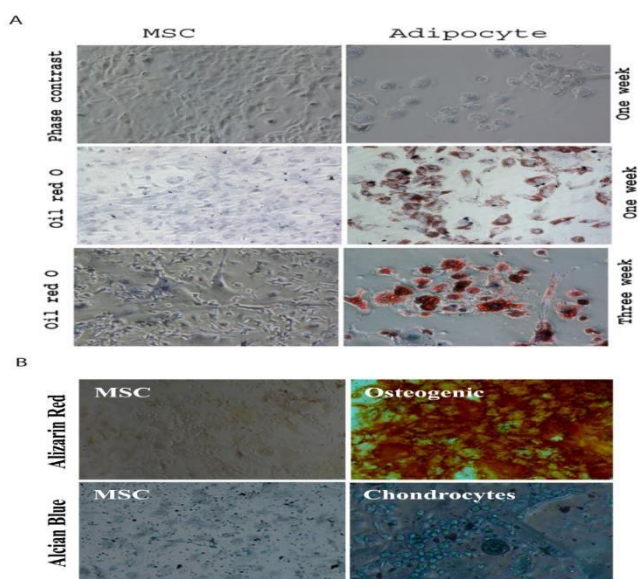
## Κεφάλαιο 3. Θεραπευτικές εφαρμογές, σύγχρονα πειράματα και βιοηθικοί προβληματισμοί

### **3.1. Κλινικές εφαρμογές- Το παράδειγμα της ορθοπαιδικής**

Σε εξειδικευμένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από ερευνητές σε τραυματισμένους ιστούς, ανακαλύφθηκε ότι τα κύτταρα των τραυματισμένων ιστών εκπέμπουν σήματα, που επάγουν τη μετανάστευση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, στην τραυματισμένη περιοχή, και υποβοηθούν την ανάπλαση και επούλωση της περιοχής. Σημειώνεται ότι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους συνδετικού ιστού, δηλαδή οστά, συνδέσμους, μύες, χόνδρο, αδιποκύτταρα και τένοντες. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα υπάρχουν στο μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα, στο λίπος, αλλά και σε άλλους ιστούς του σώματος στις λεγόμενες «βλαστοκυτταρικές φωλές». Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα, με δυνατότητα να αναπαράγονται, να διαφοροποιούνται σε διάφορους ιστούς και να ενεργοποιούν σήματα του μεταβολισμού, που καταπολεμάνε τον κυτταρικό θάνατο, δηλαδή την απόπτωση (Fehlings, 2013).

Κατά την διενέργεια μίας θεραπείας ενός τραύματος στον οστίτη ιστό, για παράδειγμα, στοχεύεται η συλλογή των βλαστικών κυττάρων, από ιστούς που βρίσκονται σε αφθονία, αλλά σε «ληθαργική κατάσταση» και η μεταφορά στο σημείο της βλάβης. Ταυτόχρονα με την εναπόθεση των «ληθαργικών» βλαστοκυττάρων μεταφέρονται και αυξητικοί παράγοντες, που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια υπάρχουν φυσιολογικά στο σημείο του τραύματος, προκειμένου να συνεισφέρουν στην πήξη του αίματος και στη δημιουργία ινώδους επουλωτικού ιστού. Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν συγκεκριμένες ομάδες πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, που ενισχύουν τα κατάλληλα σήματα και κατευθύνουν τα κύτταρα στη σωστή θέση και στη διαφοροποίησή τους (Krauspe, 2009). Μέσω των ερεθισμάτων αυτών του γειτονικού κυτταρικού περιβάλλοντος, τα βλαστοκύτταρα

καταφέρνουν να διαφοροποιηθούν σε όμοιους κυτταρικούς πληθυσμούς, δηλαδή σε οστίτη ιστό, χόνδρους, τένοντες, αναπληρώνοντας τελικά τα κατεστραμμένα κύτταρα, ενώ παράλληλα γίνεται και παραγωγή θεμέλιας ουσίας, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση της βλάβης (Tobias Russell OrcID, 2020). Η χρήση των βλαστοκυττάρων στην ορθοπαιδική έχει βοηθήσει στην αντιμετώπιση και στην αποκατάσταση τραυματισμών, που πιθανά θα παρέμεναν υπό άλλες συνθήκες αθεράπευτοι ή θα απαιτούσαν χειρουργική επέμβαση, η οποία θα επιβράδυνε την γρήγορη και πιο ανώδυνη αποκατάσταση ενός ασθενή. Σε πολλές περιπτώσεις η χρήση των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι πιο ανώδυνη και στοχευμένη (JHP Hui, 2009).



**Εικόνα 11.:** Διαφοροποίηση των MSCs σε αδιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χόνδροκύτταρα σε μονοστιβαδικές καλλιέργειες. Είναι φανερή η μορφολογική διαφορά των κυττάρων. (Lydia Usha, 2013)

### **3.2. Εφαρμογές των MSCs στην πνευμονολογία- Το παράδειγμα της κυστικής ίνωσης**

Οι πρώτες καταβολές του αναπνευστικού συστήματος κατά την ανθρώπινη ανάπτυξη εμφανίζονται ήδη από την 4<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, με τη μορφή εκκολπώματος στο κοιλιακό τοίχωμα του προσθίου εντέρου. Αυτός είναι και ο λόγος που το επιθήλιο της εσωτερικής επένδυσης του λάρυγγα, της τραχείας, των βρόγχων και των πνευμόνων έχει αποκλειστικά ενδοδερμική προέλευση. Μετά το σχηματισμό εκκολπώματος ακολουθεί μια καλά οργανωμένη διαδικασία συνεχούς εκβλάστησης και διαιρέσεων των τελικών μονάδων γνωστή ως *μορφογένεση*, το αποτέλεσμα της οποίας οδηγεί στον πλήρη σχηματισμό των πνευμόνων (Elgayyar, 2013).

Η πλήρης ανάπτυξη των πνευμόνων ολοκληρώνεται στον 8<sup>ο</sup> μήνα της κύησης, αν και ξεκινάει από πολύ νωρίς στην ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς το έμβρυο μεγαλώνει στο αμνιακό υγρό και οι αεροφόροι οδοί δε θα του χρησίμευαν και γι' αυτό προηγούνται άλλα όργανα στην ανάπτυξη (Jolly, 2017).

Για την ανάπτυξη των πνευμόνων είναι υπεύθυνη μία σύνθετη αλληλουχία ρυθμιστικών και σηματοδοτικών μονοπατιών. Παράγοντες γνωστοί για το ρόλο τους στην ανάπτυξη των πνευμόνων περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, σηματοδοτικά μόρια και υποδοχείς. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι η σωστή ανάπτυξη των πνευμόνων προϋποθέτει τον σωστό χρονικό συντονισμό όλων των παραγόντων κατά τη μορφογένεση (Jolly, 2017).

Η κυτταρική πολυπλοκότητα του πνεύμονα, ο εξαιρετικά βραδύς ρυθμός πολλαπλασιασμού των πνευμονικών κυττάρων σε συνδυασμό με τις δυσκολίες που σχετίζονται με την ιστολογική ανάλυση μίας σύνθετης δομής, που πληρούται με αέρα, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την ιστολογική ανάλυση και τη μελέτη των βλαστικών κυττάρων στο όργανο αυτό. Ωστόσο, παρά τις προαναφερθείσες δυσκολίες αρκετοί τύποι βλαστικών και προγονικών κυττάρων έχουν αναγνωρισθεί στον πνεύμονα. Τα *αυτόχθονα βλαστικά κύτταρα* των πνευμόνων διακρίνονται ανάλογα με την εντόπισή τους σε βλαστικά κύτταρα τραχείας, βρόγχων, βρογχιολίων και κυψελίδων. Αυτά τα κύτταρα αποτελούν τη δεξαμενή πρώτης ανάγκης για τους πνεύμονες σε περίπτωση ιστικής βλάβης. Τα βλαστικά κύτταρα της τραχείας και των βρόγχων είναι τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν το 1977 από την ομάδα του Breeze (Breeze, 1977). Κατά την ιστική βλάβη ο πληθυσμός κυττάρων που συμμετέχει περισσότερο στην αποκατάσταση του ιστού εξαρτάται από το τοπικό μικροπεριβάλλον και τη βαρύτητα της βλάβης που έχει να αποκατασταθεί.

Τα κυψελιδικά βλαστοκύτταρα είναι ουσιαστικά τα πνευμονοκύτταρα τύπου 2, τα οποία έχουν αναγεννητική ικανότητα και σε περιπτώσεις βλάβης, αποκαθιστούν τον ιστό των κυψελίδων. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου 2, πληρούν τις προϋποθέσεις των βλαστικών κυττάρων και όπως απέδειξαν ήδη από το 1992 οι Shannon et. al, εμφανίζουν πλαστικότητα, είναι δηλαδή ικανά να διαφοροποιούνται και να αποδιαφοροποιούνται ανεξάρτητα από την κυτταρική τους διαίρεση (Shannon, 1992).

Οι παραπάνω τύποι βλαστοκυττάρων αποτελούν *αυτόχθονες* τύπους, δηλαδή κύτταρα που υπάρχουν στον ίδιο τον ιστό. Ωστόσο, υπάρχει και η πιθανότητα να μετατραπούν βλαστοκύτταρα σε κύτταρα του πνεύμονα, ενώ αυτά δεν προέρχονται από το ίδιο το όργανο. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται *μη αυτόχθονες* κυτταρικοί τύποι, συνήθως προέρχονται από το μυελό των οστών και προκύπτουν από μετανάστευση των κυττάρων στον ιστό-στόχο. Τα κύτταρα που είναι μη αυτόχθονα δέχονται ειδικά σήματα που τους δίνουν το έναυσμα να μεταναστεύσουν στον ιστό στόχο, μηχανισμοί που μέχρι και σήμερα παραμένουν άγνωστοι. Τα βλαστοκύτταρα του πνεύμονα, αλλά και τα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν μελετηθεί εκτενώς και στις μέρες μας χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ορισμένων αναπνευστικών παθήσεων, όπως το άσθμα, η κυστική ίνωση και ο καρκίνος του πνεύμονα (Dvorack, 1987).

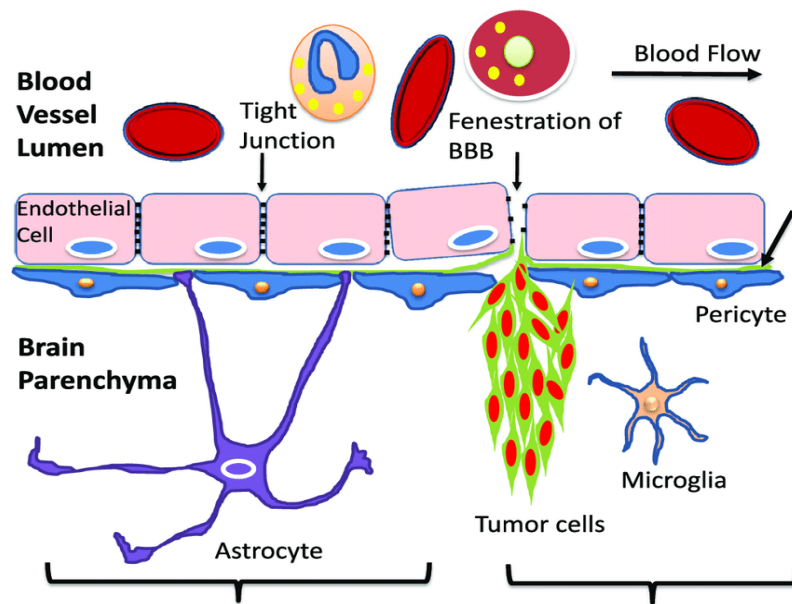
Η κυστική ίνωση είναι μία ασθένεια του πνεύμονα, η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Προκύπτει από τη μετάλλαξη του γονιδίου **CFTR** (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη-κανάλι χλωρίου. Στους ασθενείς με κυστική ίνωση παρατηρείται μία διαταραγμένη μεταφορά χλωρίου και μορίων που σχετίζονται με αυτή τη μεταφορά, ενώ οι ασθενείς είναι επιρρεπείς σε διάφορες λοιμώξεις και τελικά καταλήγουν από αναπνευστική ανεπάρκεια. Έχουν πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών σχετικά με την προσέγγιση θεραπειών για την κυστική ίνωση (Wong, 2015). Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκαν βλαστοκύτταρα του πνεύμονα προκειμένου να αναγεννηθούν οι ιστοί και να κατασκευαστούν εκ νέου κανάλια χλωρίου στους πνεύμονες. Σε μία άλλη μελέτη, και αρκετά επιτυχή, από τον Wang, το 2004, υποστηρίχθηκε ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (τα οποία διαθέτουν ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα του επιθηλίου του πνεύμονα), σε ασθενείς με κυστική ίνωση είναι επιδεκτικά στη διόρθωση του γονιδίου CFTR. Παρατήρησαν πως τα «διορθωμένα» μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα συνέβαλαν στην έκκριση χλωρίου αποκρινόμενα σε ερέθισμα με ανταγωνιστές cAMP εγείροντας την πιθανότητα ανάπτυξης σε κύτταρα-βασιζόμενης θεραπείας για την κυστική ίνωση. Αυτή η μελέτη άνοιξε το δρόμο για καινοτόμες θεραπείες σε μία μέχρι πρότινος ανίατη ασθένεια, όπως η κυστική ίνωση (Wang, 2004).

### **3.3. Μεσεγχυματικά κύτταρα ως φορείς φαρμάκων για στοχευμένη θεραπεία**

Στην επιστήμη του σχεδιασμού και της παραγωγής φαρμάκων μία σημαντική πρόκληση αποτελεί η άφιξη επαρκούς ποσότητας φαρμάκου στον επιθυμητό ιστό και την κατάλληλη χρονική στιγμή. Η χρήση βιολογικών και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, όπως οι κυτοκίνες είναι περιορισμένη, επειδή συχνά είναι ασταθή και βραχύβια μόρια, με αδιάκριτη στόχευση σε διάφορα όργανα. Λόγω τις επιθυμίας ανάπτυξης πιο αποτελεσματικών μεθόδων στοχευμένης θεραπείας, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση νανοσωματιδίων και συστημάτων παροχής κυττάρων, όπως είναι τα βλαστικά κύτταρα.

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα φαίνεται να δύνανται να χρησιμοποιηθούν και για τη μεταφορά φαρμάκων, με στόχο την υποβοήθηση της θεραπείας πληθώρας ασθενειών (BarbaraCrivelli, 2017). Η ευκολία στην απομόνωση και καλλιέργεια, αλλά και η δυνατότητα, όταν εισαχθούν σε έναν οργανισμό να κατευθυνθούν στο κατάλληλο περιβάλλον και να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, με την επίδραση των κατάλληλων σημάτων, καθιστούν αυτή την κατηγορία κυττάρων μία βέλτιστη υποψήφια, για χρήση τους με ταυτόχρονη μεταφορά φαρμάκων, προς θεραπεία ασθενειών. Τα MSCs εμφανίζονται ήδη από το πρώτο τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης στο εμβρυικό αίμα και ακόλουθα στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στον πλακούντα, στον ομφάλιο λώρο, στο περιφερικό αίμα, βλεννογόνους, οδοντικό πολφό και πλέγμα των δοκίδων του ματιού (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Η ιδιότητα που κατέστησε τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα ενδιαφέροντα τομέα μελέτης ως φορείς φαρμάκων, ήταν η ευκολία τους να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι πολύ σημαντικός για τη φυσιολογία του εγκεφάλου, καθώς προστατεύει τον εγκέφαλο από την ανεξέλεγκτη διαπερατότητα ουσιών, που δυνητικά είναι και επιβλαβείς. Αυτό το χαρακτηριστικό δυσκολεύει την παραγωγή φαρμάκων, καθώς είναι συχνό το φαινόμενο ένα φάρμακο να είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό *in vitro*, αλλά σε *In vivo* μελέτες να μη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και επομένως να μην έχει καμία θεραπευτική δράση (Sherman, 2015). Τα βλαστικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τον οργανισμό με ανοσολογικούς μηχανισμούς, διαπερνώντας ακόμη και το φραγμό του εγκεφάλου και στοχεύουν στις φλεγμένους περιοχές, λειτουργώντας όπως τα

ανοσοκατασταλικά κύτταρα (Hong-HuiWu, 2019). Λαμβάνοντας υπόψη το χαρακτηριστικό αυτό είναι φανερό ότι τα βλαστοκύτταρα δύναται να χρησιμοποιηθούν για την καταστολή φλεγμονωδών καταστάσεων, ακόμη και στην περιοχή του εγκεφάλου, καθιστώντας εύκολη τη διανομή φαρμάκων για εγκεφαλικές διαταραχές, ιδίως όγκους του εγκεφάλου, όπως το γλοιοβλάστωμα (Clavreul, 2017).



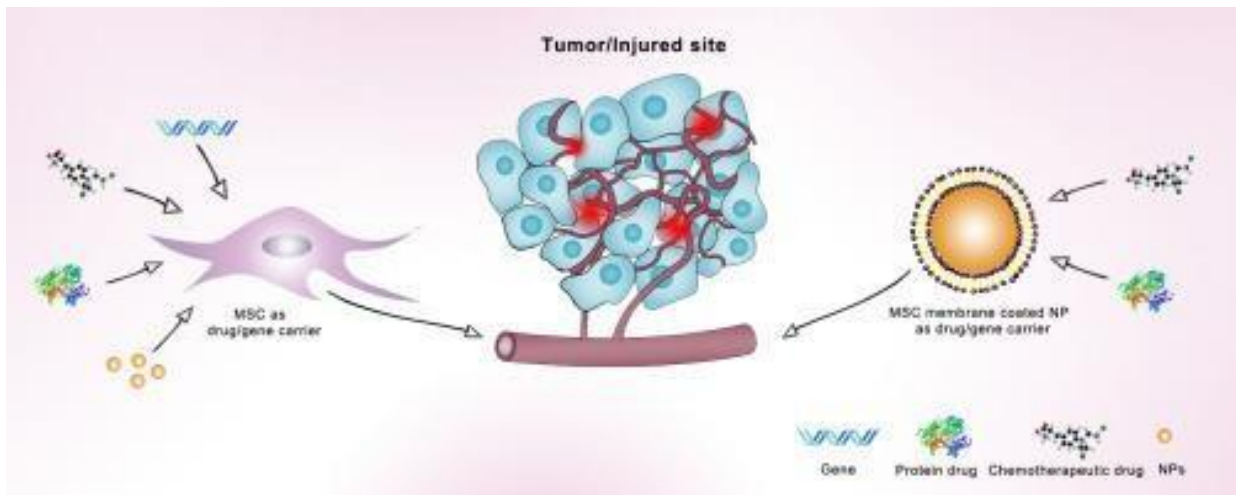
**Εικόνα 12:** Ανατομία αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Ljubimov, 2020)

Τα βλαστοκύτταρα, όταν παρουσιάζονται σε ένα μικροπεριβάλλον του οργανισμού, προσαρμόζονται κατάλληλα και εκκρίνουν τα αντίστοιχα σήματα, με σκοπό να επικοινωνήσουν με άλλα κύτταρα, να διαφοροποιηθούν, δηλαδή να αποκτήσουν ταυτότητα, και να εξασφαλίσουν τη γενικότερη επιβίωσή τους. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *homing*, ωστόσο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ακόμη, λόγω της διαφοράς στα μικροπεριβάλλοντα του οργανισμού. Στα διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα εμφανίζονται διαφορετικοί συνδυασμοί κυτοκινών, χημειοκινών και μεταγραφικών παραγόντων, γεγονός που επηρεάζει την ικανότητα *homing* των MSCs. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι ικανά να ασκούν τροποποιήσεις ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται και μέσω ανοσολογικών και βιοχημικών μηχανισμών να ρέπουν τους ιστούς προς επιδιόρθωση και συντήρηση (Abel Sa´nchez-Aguilera, 2017). Γι'αυτό το λόγο γίνεται

προσπάθεια γενετικής τροποποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων, με στόχο να μεταφέρουν φάρμακα στον επιθυμητό ιστό και στην κατάλληλη ποσότητα.

Τα MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για την παροχή κυτοκινών, προφαρμάκων, πρωτεϊνών που προκαλούν απόπτωση και αντιαγγειογόνων παραγόντων σε όγκους και άλλες περιοχές φλεγμονής. Αυτά τα ευρήματα χρησιμοποιούνται σε πολλές κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία πρωτοπαθών και μεταστατικών όγκων, καθώς και φλεγμονωδών καταστάσεων. Η χρήση MSCs ως φορείς φαρμάκων σε περιοχές φλεγμονής θα εξαρτηθεί από μία μη τυχαία διαδικασία, δεδομένου ότι τα MSCs εκφράζουν χημειοτακτικούς υποδοχείς, που τους επιτρέπουν να μεταναστεύουν στις θέσεις φλεγμονής ή αυτές των τραυματισμένων ιστών (BarbaraCrivelli, 2017). Τα MSCs είναι πλεονεκτικά ως προς τη μεταφορά φαρμάκων, επειδή μπορούν να φιλοξενηθούν σε περιοχές ανάπτυξης όγκων και είναι πλήρως ικανά για μεταγραφική, μεταφραστική και μετα- μεταφραστική έκφραση μεγάλων ποσοτήτων γενετικών πληροφοριών, που τους επιτρέπουν να εκκρίνουν θεραπευτικές ουσίες στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Παρ'όλα αυτά, αν και τα MSCs διαπερνούν ακόμη και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, το *homing* είναι αρκετά περιορισμένο στην περιοχή του εγκεφάλου. Ανεξάρτητα από το μηχανισμό, τα MSCs μπορούν να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεσματικά και να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο της απόρριψης μοσχεύματος (Das, Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, 2013). Οπότε και επιτυγχάνονται και αλλογενείς μεταμοσχεύσεις με μεγαλύτερη επιτυχία.

Τα MSC μπορούν να μεταφέρουν κυτοκίνη, πρωτεΐνες, RNA και φορτίο προφαρμάκων σε διαφορετικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των θέσεων φλεγμονής. Αποτελεσματικές θεραπείες με χρήση μεσεγχυματικών κυττάρων, που μεταφέρουν φάρμακα, έχουν ήδη επιτευχθεί και εξαπλώνεται ραγδαίως η εφαρμογή τους, σε περιπτώσεις καρκινικών όγκων, σε αυτοάνοσες νόσους, όπως η νόσος του Crohn, αλλά και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το Parkinson. Στις περιπτώσεις αυτές η μεταφορά των φαρμάκων είναι πιο στοχευμένη και με υψηλότερη αποτελεσματικότητα. Ταυτόχρονα, δεν παρουσιάζονται οι ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως συμβαίνει έπειτα από τη χορήγηση συμβατικών φαρμάκων, επειδή η δράση της φαρμακευτικής ουσίας είναι πιο στοχευμένη και όχι συστηματική (Xie, 2020).



**Εικόνα 13:** Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, Μεταφορά φαρμάκων μέσω μεσεγχυματικών κυττάρων και νανοσωματιδίων (Hong-HuiWu, 2019)

Παρόλο που μπορεί να ελοχεύουν κίνδυνοι κατά τη χρήση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε διάφορες περιπτώσεις για μεταφορά φαρμάκων, μέχρι στιγμής η έρευνα των τελευταίων χρόνων έχει αποδείξει μία ικανοποιητική ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στη χρήση των MSCs για τη μεταφορά φαρμάκων. Ωστόσο, παραμένουν ακόμη αναπάντητα ερωτήματα ως προς τη συμπεριφορά των γενετικά τροποποιημένων μεσεγχυματικών κυττάρων στον οργανισμό, τον μεταβολισμό τους και τη διαδικασία αποβολής τους.



### **3.4.**

### **Αντίδραση μοσχεύματος- ξενιστή(Graft-versus-host disease (GVHD))**

Η αντίδραση μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (GVHD) αποτελεί ένδειξη κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας και εκδηλώνεται όταν συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως λεμφοκύτταρα, χορηγούνται σε έναν αλλογενή ξενιστή, με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (Sykes, 2021). Εξαιτίας το ότι ο δότης και ο ξενιστής δεν είναι γενετικά πανομοιότυποι, τα μεταμοσχευμένα λεμφοκύτταρα επιτίθενται στον ξενιστή, ο οποίος λόγω της εξασθετισμένης κατάστασής του δε μπορεί να αποκριθεί ανοσολογικά εναντίον του μοσχεύματος. Στον άνθρωπο, οι αντιδράσεις GVH συμβαίνουν συχνά μετά από μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών, σε ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία ή έχουν λευχαιμία, ανοσοανεπάρκειες ή αυτοάνοσες αναιμίες. Η κλινική εικόνα μίας αντίδρασης GVHD περιλαμβάνει διάρροια, ίκτερο, δερματικές αλλοιώσεις, σπληνομεγαλία και μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο (Buc, 2020). Τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και του γαστρεντερικού σωλήνα συχνά νεκρώνονται, προκαλώντας αποβολή της εξωτερικής κυτταρικής στιβάδας του δέρματος και του εντέρου. Πειραματικά, αντιδράσεις GVHD αναπτύσσονται κατά τη μεταφορά ανοσοϊκανών λεμφοκυττάρων, σε αλλογενείς οργανισμούς, π.χ. ποντίκια, που μόλις έχουν ακτινοβοληθεί με ακτίνες-Χ. Οι ξενιστές, ειδικά όταν πρόκειται για νεογνά, συχνά εμφανίζουν απώλεια βάρους (Sykes, 2021). Τα μεταμοσχευμένα λεμφοκύτταρα, γενικά μεταφέρονται σε έναν αριθμό οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του σπλήνα,, όπου αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται αποκρινόμενα σε αλλογενή αντιγόνα MHC του ξενιστή. Αυτός ο πολλαπλασιασμός προκαλεί μαζική εισροή κυττάρων του ξενιστή και έχει ως αποτέλεσμα την ορατή αύξηση του μεγέθους του σπλήνα, μία κατάσταση που ονομάζεται *σπληνομεγαλία*. Η αύξηση του μεγέθους του σπλήνα οφείλεται στον πολλαπλασιασμό τόσο των CD4 και CD8 T κυτταρικών πληθυσμών. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι και τα NK κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση GVHD και τα κύτταρα αυτά μπορεί να συνεισφέρουν στις δερματικές αλλοιώσεις και στις βλάβες του εντερικού τοιχώματος, που παρατηρούνται στην GVH (Buc, 2020).

### **3.5. Κώδικας Βιοηθικής Δεοντολογίας και νομοθεσία για τις τράπεζες φύλαξης βλαστοκυττάρων και χρήση τους για ερευνητικούς σκοπούς**

Η απομόνωση των βλαστικών κυττάρων, είτε αυτά είναι εμβρυικά είτε ενήλικα, η αποθήκευσή τους και η χρήση τους μετέπειτα για θεραπευτικούς ή ερευνητικούς σκοπούς, αποτελεί ένα ευαίσθητο θέμα και έχει απασχολήσει τον τομέα της βιοηθικής, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ορθότερη δυνατή αξιοποίησή τους που αρχικά θα σέβεται τον άνθρωπο. Η ανάγκη για έναν κοινό κώδικα δεοντολογίας στον τομέα της ιατρικής και της έρευνας ξεκίνησε ήδη από το 1945. Ποιος μπορεί να ξεχάσει τα αισχρά «Επιστημονικά πειράματα» και πειράματα ευγονικής, που κατέλειξαν στα μεγαλύτερα εγκλήματα των Ναζί κατά της ανθρωπότητας; Χαρακτηριστικά είναι εξάλλου τα πειράματα του γνωστού γερμανού γιατρού του Άουσβιτς Γίωσηφ Μένγκελε, που έμεινε στην ιστορία ως ο «Άγγελος του θανάτου του Άουσβιτς» (χρόνου, 2021). Οι πρακτικές των Ναζί τα χρόνια μόνο του Β' Παγκοσμίου πολέμου είχαν ως αποτέλεσμα την θανάτωση μέσω ευθανασίας 275.000 ανθρώπων από όλο τον κόσμο, τη στείρωση 400.000 ανθρώπων, για «λόγους ευγονικής», αλλά και τον επαίσχυντο βασανισμό πάνω από 900.000 ανθρώπων παγκοσμίως (Χουλιάρα, 2017). Όλα αυτά φυσικά πραγματοποιήθηκαν παρά τη θέληση των ατόμων.

Τα εγκλήματα κατά της ανθρωπότητας των Ναζί καταδικάστηκαν στην πασίγνωστη δίκη της Νυρεμβέργης το 1945 (Editors, 2019), όπου και εκμαιεύτηκαν αποφάσεις και σχηματίστηκε ο χάρτης των *Ανθρωπίνων Δικαιωμάτων* (Nations, 2021), ο *κώδικας Ιατρικής δεοντολογίας*, όπου αναλύονται οι σωστές πρακτικές που οφείλουν να εφαρμόζονται, για την ομαλή σχέση ασθενούς και ιατρού (δημοκρατία, 2005). Έκτοτε συντάχθηκε επίσης το *πρωτόκολλο του Ελσίνκι* το 1964 (association, 1964), που αποτελεί πυλώνα ηθικής και δεοντολογίας για την διεξαγωγή επιστημονικών μελετών και η *σύμβαση του Oviedo* (Europe, 1997), το 1997, όπου επικυρώνεται μέσω του συμβουλίου της Ευρώπης η προστασία των ανθρωπίνων δικαιωμάτων και η ατομική αξιοπρέπεια, σε σχέση με εφαρμογές της βιολογίας και της ιατρικής. Η δίκη της Νυρεμβέργης και οι αποφάσεις της στάθηκαν η αφορμή, για να φτιαχτεί μία κληρονομιά για τις επόμενες γενεές, που θα στοχεύει στην προστασία και στο σεβασμό των ανθρώπων, ώστε να αποφευχθούν μελλοντικά εγκλήματα ενάντια στο ανθρώπινο είδος.

Οι πρακτικές που εφαρμόζονται για τα βλαστοκύτταρα, είτε αφορούν την έρευνα, αποθήκευση ή τη χρήση τους σε ασθενείς για θεραπευτικούς σκοπούς, υπάγονται στις νομοθεσίες που έχουν σχηματιστεί από το Ελληνικό και Ευρωπαϊκό δίκαιο, με βάση αυτές τις συμβάσεις/ αποφάσεις και τα Ανθρώπινα Δικαιώματα.

Στον τομέα της έρευνας είναι σημαντικό να αναφερθεί αδρομερώς το πρωτόκολλο του Ελσίνκι, που αποτελεί έναν κώδικα ηθικής και δεοντολογίας για την επιστημονική έρευνα στους τομείς της Ιατρικής και της Βιολογίας. Σύμφωνα με αυτό, είναι απαραίτητη η παροχή συνειδητής και ενημερωμένης συγκατάθεσης από τα υποκείμενα της έρευνας, θεωρητικό έρεισμα στην οποία αποτελεί η αρχή σεβασμού στην προστασία του ατόμου. Γενικά η συγκατάθεση πρέπει να χορηγείται ελεύθερα και αβίαστα, να είναι αποτέλεσμα τεκμηριωμένης πληροφόρησης, να αποτελεί εκδήλωση ατομικής ανεξαρτησίας, να προηγείται χρονικά του πειραματισμού, να ισχύει καθόλη τη διάρκεια της δοκιμασίας, να είναι έγγραφη και να προέρχεται από άτομο που να είναι ικανό να συναινέσει (association, 1964). Σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η γραπτή συγκατάθεση συναίνεσης, καθώς και οι δυνατότητες καταχρήσεων ή εκμετάλλευσης εξουσίας πάνω στον ασθενή, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής και προστασίας από την εκάστοτε αρμόδια Επιτροπή Ερευνητικής Δεοντολογίας (δημοκρατία, 2005).

Στην περίπτωση της φύλαξης των βλαστοκυττάρων σε τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος απαραίτητη είναι η λήψη άδειας, σύμφωνη με τις κείμενες διατάξεις για τη λειτουργία της και σε ό,τι αφορά τη συλλογή, τη συντήρηση και τη διαφύλαξη αναντικατάστατου βιολογικού υλικού, με αξιόπιστες διαδικασίες, καθώς και την προστασία των προσωπικών δεδομένων των πολιτών (<https://www.cordbloodbankcrete.gr/index.php/poioi-eimaste/ditov-kritis>, 2017). Ιδιαίτερα η προστασία των προσωπικών δεδομένων και της ιδιωτικότητας του ατόμου αποτελεί κομβικό σημείο στη νομοθεσία της ΕΕ. Υπάρχει εξελισσόμενη σχέση ανάμεσα στην τεχνολογία και το δικαίωμα του ατόμου να προστατεύεται η ιδιωτικότητά του κατά τη συλλογή, αλλά και την επεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων του και των σχετιζόμενων πληροφοριών.

Όσον αφορά στη χρήση εμβρύων ή εμβρυικού ιστού για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά και η δωρεά οργάνου, η προστασία του δότη και του δέκτη στις περιπτώσεις μεταμόσχευσης άπτονται στις νομοθετικές διατάξεις που αναφέρθηκαν πριν, για το σεβασμό των ανθρώπων και την αποφυγή πρόκλησης βιολογικής και ηθικής βλάβης. Οι

υποχρεώσεις των ερευνητών συνίστανται κυρίως στην περιγραφή της φύσης και του βαθμού δυνατότητας ταυτοποίησης των δεδομένων και των αντίστοιχων προστατευτικών μέτρων, τα οποία έχουν προβλέψει, στον καθορισμό του χρονικού διαστήματος φύλαξης των ταυτοποιήσιμων δεδομένων και στην ενημέρωση των συμμετεχόντων αναφορικά με το εύρος της δυνατότητας ταυτοποίησης με τα πρόσωπα ή το πρόσωπο που θα έχει τελικά πρόσβαση στα στοιχεία ταυτοποίησης. (commission, 2018)

Σήμερα υπάρχει πληθώρα κανονιστικών κειμένων, που αφορούν στην βιοϊατρική έρευνα σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και εθνικό επίπεδο. Η ανάπτυξη αυτού του κανονιστικού πλαισίου σχετίζεται στενά με την προστασία της σωματικής ακεραιότητας και των θεμελιωδών δικαιωμάτων του ατόμου, αφορά δε στο στάδιο του σχεδιασμού της έρευνας, στο στάδιο απόκτησης της γνώσης και των πληροφοριών και, τέλος, στο στάδιο διαχείρισης των ευρημάτων και αποτελεσμάτων. Ο Ευρωπαϊκός Χάρτης Θεμελιωδών Δικαιωμάτων, στηριζόμενος σε ένα έδαφος κοινών ευρωπαϊκών αξιών, αναγνωρίζει ότι οι τέχνες και η επιστημονική έρευνα είναι ελεύθερες υπό περιορισμούς, ότι η ακαδημαϊκή ελευθερία θα γίνεται σεβαστή, ότι κάθε άτομο έχει δικαίωμα σεβασμού στη σωματική και διανοητική του ακεραιότητα και ότι στους τομείς της ιατρικής και της βιολογίας η ελεύθερη και πληροφορημένη συγκατάθεση, πρέπει να τυγχάνουν ιδιαίτερου σεβασμού. Η ελευθερία της έρευνας κατοχυρώνεται από το άρθρο 16 παρ.1 του Συντάγματος της Ελλάδος. Το άρθρο 5 του Συντάγματος κατοχυρώνει τις ατομικές ελευθερίες του ατόμου. Στη χώρα μας ο Ν. 2619/98 ενσωματώνει στο ελληνικό δίκαιο το σημαντικότερο ευρωπαϊκό κείμενο, δηλαδή τη Σύμβαση για τα Ανθρώπινα Διακρίματα και τη Βιοϊατρική του Συμβουλίου της Ευρώπης (Σύμβαση του Oviedo) (e-νομοθεσία, 1998).

Η γνώση από όλα τα άτομα και κυρίως από τους επιστήμονες που διεξάγουν κλινικές μελέτες (π.χ. ιατροί, βιολόγοι κλπ), αλλά κυρίως η εφαρμογή των διατάξεων παραπάνω, αποτελεί το σημαντικότερο βήμα στην ορθή χρήση των βλαστοκυττάρων είτε για ερευνητικούς είτε για θεραπευτικούς σκοπούς.



**Εικόνα 14:** Γνήσιο φωτογραφικό υλικό από την έναρξη της δίκης της Νυρεμβέργης 20 Νοεμβρίου 1945. Απεικονίζονται οι κατηγορούμενοι. Η δίκη έδωσε το έναυσμα, ώστε να υπογραφεί η διακήρυξη των ανθρωπίνων δικαιωμάτων 10 Δεκεμβρίου 1948 και να αρχίζουν να εφαρμόζονται βιοηθικοί κανόνες στην επιστήμη και ιατρική (Δίκη, 2013).

### **3.6 Κανόνες βιοηθικής για χρήση των βλαστοκυττάρων και ηθικά διλήμματα**

Η θέσπιση νομοθεσιών και συμφωνιών από τα κράτη σε παγκόσμιο επίπεδο, με σκοπό την προαγωγή των ανθρωπίνων δικαιωμάτων ήταν απαραίτητο βήμα για την επιστήμη. Όλοι οι λειτουργοί που συνεισφέρουν στον τομέα της επιστήμης, είναι απαραίτητο να γνωρίζουν τις ιστορικές νομοθετικές διατάξεις και τους ηθικούς κανόνες, που συμβάλλουν στη σωστή διεξαγωγή της έρευνας ή ιατρικής πράξης, με μόνο σκοπό την υποβοήθηση της υγείας του ατόμου και πάντα με σεβασμό στην προσωπικότητα και ηθική του. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις ακόμη και αυτά τα διατάγματα παρουσιάζουν κενά, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση βιοηθικών διλημάτων.

Ως προς τη χρήση των βλαστοκυττάρων γενικότερα, και ιδίως των εμβρυικών (ESCs), γεννούνται ερωτήματα που αφορούν στο στάδιο απομόνωσής τους και στην προέλευσή τους. Πιο συγκεκριμένα, ηθικό δίλημμα που εμφανίζεται και στην περίπτωση των αμβλώσεων είναι εάν είναι ηθικό και πότε οφείλει να δώσει συγκατάθεση το άτομο,

για παράδειγμα μία εγκυμονούσα, για την απομόνωση των εμβρυικών κυττάρων (Panigrahy, 2020). Τίθενται ερωτήματα, όπως ποια είναι η υπόσταση του εμβρύου και αν η αξία του είναι ισοδύναμη με αυτή ενός προσώπου. Αν και δεν έχει χαρακτηριστικά ενός ατόμου, εντούτοις θα εξελιχθεί σε αυτό και άρα θα πρέπει να έχει όλα τα δικαιώματα αυτού. Ακόλουθα, ηθικό δίλημμα αποτελεί και η χρήση των εμβρυικών κυττάρων που έχουν απομονωθεί από αμβλώσεις για τη θεραπεία νοσημάτων ασθενών ατόμων (Al-Agele, 2020). Στις νομοθετικές διατάξεις του Ελληνικού και Ευρωπαϊκού δικαίου έχει θεσπιστεί ότι, σε περίπτωση που το έμβρυο δεν έχει εμφυτευτεί, σε αυτή την περίπτωση δε θα μπορούσε να δημιουργήσει έμβρυο και άρα δεν παραβιάζει κάποιο από τα δικαιώματά του (Genakritis, 2012). Επίσης, σε αυτή την περίπτωση δεν έχει τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες ενός ατόμου, επομένως μπορούν τα εμβρυικά κύτταρα να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις ασθενών.

Σε περιπτώσεις επιτυχούς εμφύτευσης, η νομοθεσία θεσπίζει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα εμβρυικά κύτταρα πριν τη 14<sup>η</sup> μέρα της κύησης. Η 14<sup>η</sup> μέρα μετά τη γονιμοποίηση είναι σημαντική, καθώς το κύημα μετά το στάδιο αυτό δεν μπορεί να διαιρεθεί και να δώσει γένεση σε δίδυμα. Επιπρόσθετα, ήδη από τη 14<sup>η</sup> μέρα σχηματίζεται το ΚΝΣ και δημιουργούνται οι αισθήσεις, επομένως η χρήση των εμβρυικών βλαστοκυττάρων απαγορεύεται ρητά (Mahalatchimy, 2021).

Στο ελληνικό θεσμικό πλαίσιο υπογραμμίζεται ότι βλαστοκύστες που δεν έχουν εμφυτευτεί μπορούν με τη συγκατάθεση του δότη και μόνο να χρησιμοποιηθούν για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς (Ν.3089/ 2002) (<https://www.e-nomothesia.gr/kat-ygeia/tekhnete-gonimopoiese/n-3089-2002.html>, 2002). Επίσης, γονιμοποιημένα ωάρια μετά τις 14 μέρες πρέπει να καταστραφούν, εάν δεν καταψυχθούν. Σε κάθε περίπτωση ο ερευνητής ή γιατρός οφείλει να έχει πάρει πρώτα τη συγκατάθεση του ατόμου πρωτού προχωρήσει σε περαιτέρω ενέργειες. Φυσικά, να προστεθεί, ότι η κλωνοποίηση στον άνθρωπο είναι μία διαδικασία που απαγορεύεται, επομένως τα βλαστοκύτταρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό το σκοπό (Sideri, 2020).

Η νομοθεσία αφορά κυρίως στις περιπτώσεις των εμβρυικών βλαστοκυττάρων και όχι τόσο των σωματικών βλαστοκυττάρων, διότι τα εμβρυικά κύτταρα αν και πολυδύναμα απομονώνονται από έμβρυα, τα δικαιώματα των οποίων ως εν δυνάμει άνθρωποι

οφείλουν να προστατευτούν. Στην περίπτωση των υπόλοιπων τύπων βλαστοκυττάρων η νομοθεσία είναι λιγότερο σύνθετη. Ο ερευνητής ή ο γιατρός που χρησιμοποιεί τα βλαστοκύτταρα για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς οφείλει να συμμορφώνεται με τις διατάξεις που θεσπίζονται σε Ελληνικό και Ευρωπαϊκό δίκαιο και να λαμβάνει σε κάθε περίπτωση γραπτή συγκατάθεση από τον άμεσα ενδιαφερόμενο, που έχει σώας τα φρένας του (Sideri, 2020). Ο επιστήμονας οφείλει να εξυπηρετεί τον άνθρωπο, να προάγει την υγεία του και να ακολουθεί τόσο τυπικούς όσο και άτυπους κανόνες ηθικής, με κύριο μέλημα πάντα την προαγωγή της υγείας, τόσο της σωματικής, όσο και της ψυχικής (Sideri, 2020). Με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στην πρόοδο και στην αποφυγή πιθανών ενεργειών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εγκλήματα κατά της ανθρωπότητας.

## Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία προσπάθεια ανασκόπησης της βιολογίας των μεσεγχυματικών κυττάρων, αλλά και ορισμένων εφαρμογών τους. Για τη βέλτιστη δυνατή κατανόηση των ιδιοτήτων των μεσεγχυματικών κυττάρων, καθώς και της προέλευσής τους, θεωρήθηκε σκόπιμο να παρατεθούν, αδρομερώς, ορισμένα από τα πιο βασικά γεγονότα της ανάπτυξης ενός εμβρύου. Παράλληλα, αναφέρθηκαν οι πιο σημαντικές νομοθετικές διατάξεις, που ισχύουν μέχρι και σήμερα και κατοχυρώνουν τη σωστή χρήση των κυττάρων αυτών, τόσο για ερευνητικούς, όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς.

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη μελέτη των βλαστοκυττάρων και ιδιαίτερα των μεσεγχυματικών. Τα κύτταρα αυτά συχνά συμβάλλουν καταλυτικά στην επίλυση προβλημάτων υγείας, που υπό άλλες συνθήκες θα παρέμειναν άλυτα, όπως στην περίπτωση της κυστικής ίνωσης, που παρατέθηκε στην *παράγραφο 3.2* του κειμένου. Παρ'όλο που η χρήση τους αρχίζει να γίνεται ευρεία, η βιολογία τους παραμένει ένα σαγηνευτικό κομμάτι, που άπτεται των ερευνητικών αναζητήσεων.

Τα βλαστοκύτταρα είναι τα κύτταρα από τα οποία θα σχηματιστούν όλα τα όργανα ενός εμβρύου. Από ένα ωάριο και ένα σπερματοζωάριο με τη συμβολή των βλαστοκυττάρων θα σχηματιστεί ένας πλήρως λειτουργικός οργανισμός. Τα βλαστοκύτταρα, όμως δε συμμετέχουν μόνο στην ανάπτυξη κατά τη διαφοροποίησή τους σε πληθώρα κυτταρικών τύπων. Τα ίδια εντοπίζονται και κατά την ενήλικη ζωή στις βλαστοκυτταρικές φωλέες, όπου και παραμένουν εκεί, ως ότου παραστεί ανάγκη από τον οργανισμό, όπως για παράδειγμα συμβαίνει κατά την επούλωση ενός τραύματος. Τα κύτταρα κατά την ενήλικη ζωή ονομάζονται σωματικά βλαστοκύτταρα και συμβάλλουν επίσης και στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

Τα βλαστοκύτταρα, εν αντιθέσει με τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα έχουν πολλές δυνατότητες και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ο τρόπος διαίρεσής τους διαφέρει σε σχέση με τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαιρούνται συμμετρικά, απ'όπου προκύπτουν δύο ίδια θυγατρικά κύτταρα, όσο και ασύμμετρα, απ'όπου προκύπτουν ένα θυγατρικό και ένα διαφοροποιημένο κύτταρο. Η



ιδιότητα αυτή είναι μοναδική και μοιάζει να χαρίζει στα βλαστοκύτταρα «νοημοσύνη», καθώς αυτά γνωρίζουν πότε πρέπει να κάνουν συμμετρική και πότε ασύμμετρη διαίρεση. Επιπλέον, αν και φαίνεται χαώδης ο τρόπος λειτουργίας των κυττάρων, απεναντίας, η οργάνωσή τους βρίσκεται σε απόλυτη τάξη, ώστε τελικά να καταλαβαίνουν την ακριβή τους θέση στον οργανισμό, να επικοινωνούν αρμονικά με τα γειτονικά κύτταρα και τελικά να διαφοροποιούνται στον κατάλληλο κάθε φορά κυτταρικό τύπο. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ισορροπία του οργανισμού.

Σε περιπτώσεις ανισορροπίας, όπως για παράδειγμα σε παρατεταμένες περιόδους άγχους, ο οργανισμός αλλάζει την ομοιοστατική μεταγραφική του δραστηριότητα και μεταγράφει γονίδια που σχετίζονται με μία κατάσταση που ονομάζεται *φλεγμονή*. Οποιαδήποτε κατάσταση σωματική, αλλά ακόμη και ψυχολογική, επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα και επομένως τη βιοχημική λειτουργία του κυττάρου και ευρύτερα του οργανισμού. Πληθώρα ασθενειών έχουν συσχετιστεί με τη φλεγμονή, η οποία έχει φανεί ότι επηρεάζει και τη λειτουργία των βλαστοκυττάρων αρνητικά, επάγοντάς τα να μετατραπούν σε καρκινικά, ακόμη και μέσα από την βλαστοκυτταρική φωλέα (SarahShigdar, 2014). Η χρόνια φλεγμονή επίσης έχει ενοχοποιηθεί και για την αρνητική επίδραση που έχει στα βλαστοκύτταρα, σε περιπτώσεις που αυτά δεν διαιρούνται επαρκώς, δε στοχοποιούν την προβληματική θέση στο σώμα και δε διαφοροποιούνται στο σωστό κυτταρικό τύπο. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της κακής επούλωσης τραύματος στο πόδι σε έναν οργανισμό που πάσχει από διαβήτη τύπου 2, μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως «διαβητικό πόδι». Σημειώνεται ότι ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία νόσο άμεσα συνδεδεμένη με τη χρόνια φλεγμονή (Burgos-Morón, 2019).

Στις μέρες μας η κύρια και πιο σύντομη μέθοδος εντοπισμού των βλαστοκυττάρων (άρα και των μεσεγχυματικών κυττάρων) είναι η κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή εξελίσσεται συνεχώς και αυξάνει τις δυνατότητες των επιστημόνων να εντοπίζουν με ακρίβεια και πιο γρήγορα τα κύτταρα στόχους τους. Η ανακάλυψη μεθόδων ικανών ανίχνευσης συγκεκριμένης κατηγορίας κυττάρων, αλλά και η οπτικοποίησή τους σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, ίσως δώσει απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα που ταλανίζουν την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις εφαρμογές τους, τη βιολογία και τις δυνατότητές τους.

Οι ερευνητές από την πρώτη κιόλας στιγμή της ανακάλυψης των βλαστοκυττάρων γοητεύτηκαν από το γεγονός ότι ίσως υπήρχε ένας τρόπος να θεραπεύσουν ανίατες νόσους, να αναγεννήσουν ιστούς ή ολόκληρα όργανα από το μηδέν. Όσο περισσότερο ερευνώνται σε βάθος χρόνου, αποκαλύπτεται όλο και περισσότερο η δυναμική των κυττάρων αυτών, η πλαστικότητα τους και η ικανότητα μεταμόρφωσής τους ανάλογα με το περιβάλλον που εκτίθενται. Τα κύτταρα αυτά φαντάζουν σαν να έχουν νικήσει το χρόνο, να κινούνται σε δικούς τους βιορρυθμούς και να κατοικούν στο σώμα μας, ώστε όταν τα έχουμε ανάγκη, να συμβάλλουν εκ νέου στην αποκατάσταση της ισορροπίας.

Η παραπάνω ιδέα, σε συνδυασμό με το θαύμα της ανάπτυξης, άλλαξε τα δεδομένα της επιστήμης. Η ανακάλυψη των βλαστοκυττάρων υπενθύμισε στον άνθρωπο τη σοφία της φύσης, αλλά και τις απεριόριστες δυνατότητες που αποκαλύπτονται ότι υπάρχουν στο βιοχημικό εργοστάσιο, που ονομάζεται άνθρωπος. Ο άνθρωπος οφείλει σεβασμό στη φύση της οποίας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι. Ο ρόλος του επιστήμονα είναι να προβληματίζεται και να εξετάζει όλες τις όψεις του νομίσματος, χωρίς να συντηρεί προκατειλημμένες ιδέες. Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, οφείλουμε να θυμόμαστε ότι η επιστήμη είναι ο σύγχρονος Ιανός- ο μυθολογικός θεός των Ρωμαίων με τα δύο πρόσωπα. Σαν αυτόν, λοιπόν, και η επιστήμη, όσο και να αναπτύσσεται, δε θα παύει να έχει δύο όψεις- την καλή και την κακή. Είναι χρέος του επιστήμονα να ακολουθεί κανόνες ηθικής και να διατηρεί ανοιχτούς πνευματικούς ορίζοντες, με σκοπό την προαγωγή της υγείας του ανθρώπου και της ισορροπίας της φύσης.

## Βιβλιογραφικές αναφορές

- A.Knoblich, J. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*.
- Abel Sa´nchez-Aguilera, S. M.-F. (2017). *The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia*. Crossmarker.
- Al-Agele, R. A. (2020). DO EMBRYONIC STEM CELLS GIVE A NEW DIRECTION FOR THERAPEUTIC. *Journal of natural remedies*.
- Albertus W. Wognum. (2015). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *stem cell technologies*.
- Alona Epshtein, L. S. (2017). Isolating and Analyzing Cells of the Pancreas Mesenchyme by Flow Cytometry.
- Angela Betsaida B. Laguipo, B. (2019). Stem Cell Therapy for Alzheimer's. *News medical life sciences*.
- Ann-Kristin Picke 1, G. M.-H. (2018). Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity. *Science tranplant Medicine* .
- association, W. m. (1964). WMA DECLARATION OF HELSINKI – ETHICAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN SUBJECTS. *World Medical Association*.
- Atashzar, M. R. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of cellular phyciology*.
- Atindriya Biswas 1, R. H. (2007). Embryonic stem cells.
- BarbaraCrivelli. (2017). Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *Journal of control release*.
- Begüm Aydin, E. O. (2019). Cell Reprogramming: The Many Roads to Success. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Bettters, D. M. (2015). Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *advance practioner oncology*.
- Breeze, R. (1977). The cells of the pulmonary airways. *American reviews of respiratory system*.
- Buc, M. (2020). Mechanisms of action of regulatory lymphocytes and a possibility to use them in the treatment of autoimmune diseases and GvH reactions. *Europe PMC*.
- Burgos-Morón, E. (2019). Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *Journal of clinical medicine*.

- Cathy, O. (2017). *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago: Crown Random House.
- Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts.
- Clavreul, A. (2017). Human mesenchymal stromal cells as cellular drug-delivery vectors for glioblastoma therapy: a good deal? *Journal of experimental & Clinical cancer research*.
- commission, E. (2018). Data protection.
- Das, M., Inger Birgitta Sundell, & S.Koka, P. (2013). Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. *Journal of the stem cells*, 1-16.
- Dolly Mushahary, A. S. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells.
- Dvorack. (1987). Thrombosis and cancer. *Human Pathology*.
- Editors. (2019). Nuremberg trials. *History*.
- Elgayyar, M. E. (2013). Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Frontiers in cell and development*.
- Europe, C. o. (1997). Oviedo Convention and its Protocols.
- e-νομοθεσία. (1998). Νόμος 2619/1998 - ΦΕΚ 132/Α/19-6-1998.
- F.Dvorak, M. (1987). Thrombosis and cancer. *Human Pathology*.
- Farshad Nassiri, M. D. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*.
- Fehlings, R. V. (2013). Mesenchymal Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury: Current &. *Current stem cell research and therapy*.
- Ferreira, L. M. (2014). Stem cells: a brief history and outlook. *Harvard university, medical school*.
- Flow Cytometry. (n.d.). *MKS*.
- Genakritis, C. (2012). Bioethics and european union legal records regarding stem cells.
- George Kolios, Y. M. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine.
- George, J., Manjusha, W., Jegan, S., Mahijia, S., & Josphin, J. (2017). A Review of Stem Cells in Regenerative Medicine. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*.
- Gilbert, L. A. (2020). Mapping cancer genetics at single-cell resolution. *Science*.
- Gilbert, S. F. (2017). Developmental biology, the stem cell of biological disciplines. *PLoS Biol*.

- Givan, A. L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology*.
- Guanglun, M. M., Yang, H., & Yan, W. (2017, October). Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, pp. 125-134.
- H Xie, N. D. (2018). Functional Odontoblastic-Like Cells Derived from Human iPSCs. *J. Dental*.
- Hans Clevers, K. M. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*.
- Hassan Abdulrazzak, D. M. (2010). Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of royal society* .
- Hassan Abdulrazzak, D. M. (2010). Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues.
- Hong-HuiWu. (2019). Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *Journal of controlled release*.
- Horecka. (2014). Characteristics of hematopoietic stem cells. *cytotechnology*.
- Hout, M. E. (2020). Crosstalk between autophagy and metabolic regulation of cancer stem cells. *Springer Link*.
- <https://www.cordbloodbankcrete.gr/index.php/poioi-eimaste/ditov-kritis>. (2017). Retrieved from Δημόσια Τράπεζα Ομφαλικών Βλαστοκυττάρων Κρήτης.
- <https://www.e-nomothesia.gr/kat-ygeia/tekhnete-gonimopoiese/n-3089-2002.html>. (2002, 12 30). Retrieved from e- nomothesia.
- Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Protocols. (2018). *Merck*.
- International Society for Cellular Therapy (ISCT) Guidelines on Multipotent Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Characterization. (2018). *Merck*.
- Iscove, N. (2011). Ernest McCulloch. *Cell Stem Cell*, 250-251.
- iStock by Getty images*. (2017). Retrieved from <https://www.istockphoto.com/vector/human-embryonic-development-showing-stages-from-egg-and-fertilization-to-gm835790860-135902325>.
- Jessica Cristina Marín-Llera, J. C.-M. (2018). A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture. *Cell biology*.
- JHP Hui, M. A. (2009). Review Article: Stem Cell Therapy in Orthopaedic Surgery:. *Malaysian Orthopaedic Journal* .
- Jirong Yang, Y. L. (2019). Influence of hydrogel network microstructures on mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro and in vivo. *Acta Biomater*.

- Jolly, M. K. (2017). Epithelial–mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *American association for anatomy*.
- Katrin E Hostettler, A. G. (2017). Multipotent mesenchymal stem cells in lung fibrosis. *journal.pone*.
- Kezhe Tan, H. Z. (2019). CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem cells*.
- Komarova, N. (2013). Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer? *Plos one*.
- Krauspe, R. (2009). Cord Blood—An Alternative Source for Bone Regeneration. *Stem cell*.
- Laboratoryhub. (2018). Let’s Discuss the Formation of Blood Cells i.e. Hematopoiesis.
- Lathia, J. (2020). The Clinical Impact of Cancer Stem Cells. *The Oncologist*.
- Ljubimov, A. V. (2020). Brain blood barrier. *Researchgate*.
- Lopez. (2018). The stem cell division theory of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.
- Lydia Usha. (2013). Mesenchymal Stem Cells Develop Tumor Tropism but Do Not Accelerate Breast Cancer Tumorigenesis in a Somatic Mouse Breast Cancer Model. *Plos one*.
- Mahalatchimy, A. (2021). Regulation of stem cell research in Europe. *Eurostem cell*.
- Majumdar, S. (2020). Cell division symmetry control and cancer stem cells. *AIMS Molecular science*.
- Mariusz Z Ratajczak, J. R.-M. (2017). A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells.
- MartinBergert, S. (2021). Cell Surface Mechanics Gate Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem cell*.
- Maxime Ducret, J.-C. F.-G.-G. (2019). Phenotypic Identification of Dental Pulp Mesenchymal Stem/Stromal Cells Subpopulations with Multiparametric Flow Cytometry.
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview.
- Morrissey, J. (2018, August 2). *The New York Times*. Retrieved from How to Write a Good College Application Essay:  
<https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?rref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education&region=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>

- Nations, U. (2021). *Universal declaration of human rights*. Retrieved from [https://www.un.org/en/about-us/universal-declaration-of-human-rights:](https://www.un.org/en/about-us/universal-declaration-of-human-rights) <https://www.un.org/en/about-us/universal-declaration-of-human-rights>
- Novik, A. A. (2009). The Maximow 1909 centenary: A reappraisal.
- Osman, A. (2020). Revisiting Cancer Stem Cells as the Origin of Cancer-Associated Cells in the Tumor Microenvironment: A Hypothetical View from the Potential of iPSCs. *MDPI*.
- Panigrahy, S. (2020). Bioethical Issues in Stem Cell Research. *Bioethical issues in stem cell research*.
- Pauline Damien, D. S. (2015). Regenerative Therapy and Immune Modulation Using Umbilical Cord Blood-Derived Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*.
- Peter Karagiannis, K. T. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development.
- Piotrowski, I. (2020). Interplay between inflammation and cancer. *Via medical Journals*.
- Pohl, H. (2019). Stem Cells: from Embryonic Origin to Induced Pluripotency – An Overview. *Enzo*.
- Pozzobon, M., Piccoli, M., & De Coppi, P. (2012). *Sources of Mesenchymal Stem Cells: Current and Future Clinical Use*. Berlin: Springer-Verlag.
- R. Mafi, S. H. (2011). Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells Applicable for Musculoskeletal. *The Open Orthopaedics Journal*.
- Rhiannon Nancarrow-Lei, P. M. (2017). A Systemic Review of Adult Mesenchymal Stem Cell Sources and their Multilineage Differentiation Potential Relevant to Musculoskeletal Tissue Repair and Regeneration.
- Roberto Berebichez-Fridman, P. R.-O. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review.
- Rogers. (2014). Umbilical cord blood stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*.
- Safa Aydin, F. Ş. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Medical Biology*.
- Sam Behjati, S. L. (2018). Mapping human development at single-cell resolution.
- Sarah Shigdar. (2014). Inflammation and cancer stem cells. *Cancer letters*.
- Sensebe, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., & Giordano, R. (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox sanguinis*, 98(2), 93-107.
- Seon-Yeong Jeong, J.-A. K.-H. (2018). The Adaptive Remodeling of Stem Cell Niche in Stimulated Bone Marrow Counteracts the Leukemic Niche.

- Shannon, M. (1992). Three Essential Promoter Elements Mediate Tumour Necrosis Factor and Interleukin-1 Activation of the Granulocyte-Colony Stimulating Factor Gene. *Taylor Francis online*.
- Sharma, R., Pollock, K., Hubel, A., & McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem cells and stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practises. *Tranfusion, 54(5)*, 1418-1437.
- Sherman, L. S. (2015). A discussion on adult mesenchymal stem. *Therapeutic delivery*.
- Shinya Yamanaka, K. T. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*.
- Sideri, K. (2020). Regulation of stem cell research in Greece. *Euro stem cell*.
- Slack, J. M. (2009). *Essential Developmental Biology, 2nd Edition*. Wiley-Blackwell.
- Stephanie N Hurwitz, S. K. (2020). Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukaimia*.
- Sykes, M. (2021). Lymphohematopoietic graft-versus-host responses promote mixed chimerism in patients receiving intestinal transplantation. *The journal of clinical investigation*.
- Szydlak, R. (2018). Mesenchymal stem cells' homing and cardiac tissue repair. *Biochim. Pol.*
- Tandis Vazin, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*.
- Tobias Russell OrcID, A. W. (2020). IL-17A and TNF Modulate Normal Human Spinal Enteseal Bone and Soft Tissue Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis, Adipogenesis, and Stromal Function. *MDPI*.
- Toka A Ahmed, W. G.-B. (2020). Human Adipose-Derived Pericytes: Biological Characterization and Reprogramming into Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Physiology and Biochemistry*.
- Toshio Heike, T. N. (2014). Stem Cell Plasticity in the Hematopoietic System.
- Toshio Miki, T. L. (2009). Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*.
- Ullah, I., Subbarao, R., & Rho, G. (2015). *Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective*. *Bioscience reports*, 35(2).
- VALLIER, A. K. (2010). Emerging use of stem cells in regenerative medicine.
- Vellasamy S, S. P. (2012). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells*.
- Wai Feng Lim, T. I.-Y. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.



- Wang. (2004). Mutation Independent Knockdown of Mutant mRNA by RNA Interference and Replacement by mRNA with Knockdown-Resistant Codons. *Central nervous system 2*.
- Wong, A. P. (2015). Efficient generation of functional CFTR-expressing airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature protocols*.
- Wood, K., Issa, F., & Hester, J. (2016). Understanding stem cell immunogenicity in therapeutic applications. *Trends in Immunology, 37(1)*, 5-16.
- Xie, M. T. (2020). Mesenchymal Stem Cells Mediated Drug Delivery in Tumor-Targeted Therapy. *Current drug delivery*.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell, 10(6)*, 678-684.
- Yamashita, Y. M. (2010). Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harbor*.
- Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *JCB*.
- Youmna Kfoury, D. T. (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell biology*.
- Yu, Z., Pestell, T., Lisanti, M., & Pestell, R. (2012). Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology, 44(12)*, 2144-2151.
- Yueh-Hsun Kevin Yang, C. R.-Y. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro.
- Δεληγεώργη-Πολίτη, Ε. (2013). Βλαστοκύτταρα: Η μεγάλη ελπίδα της ιατρικής για τον 21ο αιώνα.
- δημοκρατία, Ε. (2005, Νοεμβρίου 28). *Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας*. Retrieved from <https://www.hcs.gr/UsersFiles/Documents/nomothesia/iatrikideontologia.pdf>
- Δίκη. (2013). Δίκη της Νυρεμβέργης. *Μηχανή του χρόνου*.
- Κολιάκος, Γ., Ζουμπουρλής, Β., & Αναστασόπουλος, Μ. (2012). Βλαστοκύτταρα: Θεραπευτικές εφαρμογές και βιοηθικά διλήμματα στη χρήση τους.
- Μηλιαράς. (2004). ΑΤΛΑΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ. *Ιατρική σχολή ΑΠΘ*.
- Ρουμπελάκη. (2020). Βιολογία και τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων. Εργαστήριο κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας, Ίδρυμα ιατροβιολογικών ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.
- Χουλιάρα, Γ. (2017). Υβρίδια ανθρώπων και ζώων. Πειράματα για τη δημιουργία του υπερανθρώπου. *Geopolitics ^ Daily news*.

χρόνου, Μ. τ. (2021). *Γιόζεφ Μένγκελε. Ο καταζητούμενος γερμανός γιατρός του Άουσβιτς και το θρίλερ της καταδίωξης στην Κύθνο. Τα φρικτά πειράματα που έμειναν ατιμώρητα...* Retrieved from Μηχανή του χρόνου .

## Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1: (Angela Betsaida B. Laguipo, 2019)

Εικόνα 2: (iStock by Getty images, 2017)

Εικόνα 3: (Pohl, 2019)

Εικόνα 4: (Laboratoryhub, 2018)

Εικόνα 5: (Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Protocols, 2018)

Εικόνα 6: (Μηλιαράς, 2004)

Εικόνα 7: (International Society for Cellular Therapy (ISCT) Guidelines on Multipotent Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Characterization, 2018)

Εικόνα 8: (Seon-Yeong Jeong, 2018)

Εικόνα 9: (Flow Cytometry)

Εικόνα 10: (Vellasamy S, 2012)

Εικόνα 11: (Lydia Usha, 2013)

Εικόνα 12: (Ljubimov, 2020)

Εικόνα 13: (Hong-HuiWu, 2019)

Εικόνα 14: (Δίκη, 2013)