

Ο ρόλος των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική

Μαρία Γ. Ρουμπελάκη¹, Νικόλαος Π. Ανάγνου²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Η Αναγεννητική Ιατρική, αποτελεί τον τέταρτο και πολλά υποσχόμενο πυλώνα για την παγκόσμια υγεία και μαζί με την Εμβιομηχανική Ιστών και την Κυτταρική Θεραπεία, αναμένεται να συνεισφέρουν στην παραγωγή νέων προγνωστικών και θεραπευτικών μέσων καθώς και καινοτόμων λύσεων για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια, τα μεσεγχυματικά στρωματικά/βλαστικά κύτταρα (MSCs) είναι στο επίκεντρο αυτού του επιστημονικού πεδίου. Τα MSCs αποτελούν μία υποομάδα προγονικών κυττάρων, που εμφανίζουν τη δυνατότητα της διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης (όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα) και της *in vivo* αποκατάστασης του ομόλογου ιστού. Παρ' όλο που τα καλύτερα χαρακτηρισμένα MSCs είναι τα προερχόμενα από τον μυελό των οστών (BM), πρόσφατα το ενδιαφέρον έχει στραφεί και σε εναλλακτικές πηγές εμβρυϊκής προέλευσης, όπως το αμνιακό υγρό (AF), ο ομφάλιος λώρος (UC), οι αμνιακές μεμβράνες (AM) και ο πλακούντας. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, αλλά και της δυνατότητας χρήσης τους σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις, τα MSCs φαίνεται να αποτελούν ένα ελκυστικό εργαλείο στο πλαίσιο της Εμβιομηχανικής των Ιστών και της Κυτταρικής Θεραπείας. Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται εκτενής αναφορά στις ιδιότητες αυτών των κυττάρων, στην προέλευσή τους και παρουσιάζονται τα μέχρι τώρα δεδομένα που ενισχύουν την ενδεχόμενη χρήση τους στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής.

Haema 2016; 7(1): 18-26 Copyright EAE

Αναγεννητική ιατρική

Τα τελευταία χρόνια, εκτός των θεραπειών που βασίζονται σε φαρμακευτικά και βιολογικά προϊόντα ή ιατρικά μηχανήματα¹, η Αναγεννητική Ιατρική έχει εισέλθει εντυπωσιακά στην κλινική θεραπευτική, και μέσω της Κυτταρικής Θεραπείας αποτελεί τον τέταρτο και πολλά υποσχόμενο πυλώνα για την παγκόσμια υγεία. Η Εμβιομηχανική Κυττάρων και Ιστών, μαζί με την Κυτταρική Θεραπεία και τη χρήση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις πολλών σοβαρών ασθενειών και των συναφών προβλημάτων της δημόσιας υγείας¹. Η διεπιστημονική προσέγγιση διαφορετικών πεδίων όπως η Εμβιομηχανική Ιστών, η Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία υπόσχεται να οδηγήσει στη

δημιουργία νέων προγνωστικών και θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών².

Το ενδιαφέρον έχει πρόσφατα στραφεί στο πεδίο της Αναγεννητικής Ιατρικής και συγκεκριμένα στη χρήση βλαστικών κυττάρων για την αποκατάσταση της ιστικής βλάβης σε διάφορες νόσους, ιστικές δυσλειτουργίες ή τραυματισμούς¹. Είναι φανερό πως τα βλαστικά κύτταρα μονοπωλούν το ενδιαφέρον περισσότερο από κάθε άλλο πεδίο στη Βιολογία τα τελευταία χρόνια και αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην ανεύρεση δυναμικών θεραπειών με εφαρμογή στα εκφυλιστικά νοσήματα και στην Αναγεννητική Ιατρική.

Η Αναγεννητική Ιατρική έχει εισαγάγει νέες μεθόδους για την αντικατάσταση ή την αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων κυτταρική θεραπεία, χρήση βιοϋλικών ή χρήση ικριωμάτων². Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται αυτόλογα ή αλλογενή κύτταρα (cell replacement), γενετικά τροποποιημένα κύτταρα (cell based gene therapy), βλαστικά ή πρόδρομα κύτταρα καλλιεργημένα σε ικριώματα (tissue engineering)^{1,3}.

¹Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών και

²Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Μαρία Γ. Ρουμπελάκη, DPhil, Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μικράς Ασίας 75, 11527 Αθήνα, Τηλ: +30210 7462145, +30-210-6597013, Fax: +30 210 6597545, E-mail: roubel@med.uoa.gr

Η κυτταρική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα καθώς είναι λιγότερο επεμβατική μέθοδος, σχετίζεται με μικρότερα ποσοστά θνητότητας και νοσηρότητας, προκαλεί χαμηλότερη ανοσολογική αντίδραση και επιπλέον δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ιδανική θεραπεία αφού δεν απαιτείται να πραγματοποιηθεί ολοκληρωτική αντικατάσταση του οργάνου, αλλά μία μικρή ποσότητα κυττάρων μπορεί να συντελέσει στην ανάκτηση της μεταβολικής λειτουργίας του κατεστραμμένου ιστού¹. Παρ' όλα αυτά, η επιτυχής εφαρμογή της κυτταρικής θεραπείας εξαρτάται από πολυάριθμους παράγοντες, οι οποίοι σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να μελετούνται λεπτομερώς. Ακόμη απαιτείται (i) εις βάθος μελέτη της βιολογίας των βλαστικών/πρόδρομων κυττάρων, (ii) διαθεσιμότητα καλά καθορισμένων ζωικών προτύπων για προκλινικές μελέτες και (iii) ανάπτυξη της γενετικής τροποποίησης ή γονιδιακής μεταφοράς σε βλαστικά κύτταρα¹. Επομένως, οι προοπτικές της κυτταρικής θεραπείας στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής είναι τεράστιες, παρά το ότι υπάρχουν σημαντικά εμπόδια μέχρι στιγμής, τα οποία θα πρέπει να επιλυθούν, πριν μεταφερθεί η τεχνολογία αυτή στην κλινική πράξη.

Στο πλαίσιο αυτό, ένας πολλά υποσχόμενος κυτταρικός τύπος είναι τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (mesenchymal stem/stromal cells - MSCs). Είναι ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων, με δυνατότητα διαφοροποίησης κυρίως σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, που θεωρούνται ένα ιδιαίτερα ελκυστικό εργαλείο για νέες θεραπευτικές προσπελάσεις⁴.

Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs)

Ο όρος «μεσέγχυμα» αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί ο αναπτυσσόμενος χαλαρός συνδετικός ιστός του εμβρύου, ο οποίος προέρχεται κυρίως από το μεσόδερμα και έχει τη δυνατότητα να δίνει γένεση σε κύτταρα του συνδετικού ιστού του ενήλικου. Τα MSCs χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά από τον Friedenstein και συν. στο μυελό των οστών αρουραίου και απεδείχθη ότι ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν αρχικώς σε οστεοκύτταρα⁵. Έκτοτε, MSCs έχουν απομονωθεί και στον άνθρωπο από διάφορους ιστούς κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης, όπως το αμνιακό υγρό, ο ομφάλιος λώρος, το αίμα του ομφάλιου λώρου, ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός⁶⁻¹⁴.

Όπως προαναφέρθηκε, τα MSCs αποτελούν υποομάδα προγονικών κυττάρων, έχουν τη δυνατότητα της διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς της μεσοδερμικής σειράς και της *in vivo* αποκατάστασης του ιστού, τον οποίο δημιουργούν¹⁵. Πρόσφατα απεδείχθη και η ικανότητα αυτοανανέωσης των κυττάρων αυτών σε *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις¹⁶⁻¹⁸. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους, τα MSCs φαίνεται να αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο

και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στο πλαίσιο της εμβιομηχανικής ιστών και της κυτταρικής θεραπείας^{4,15,19-21}.

Με τα σημερινά δεδομένα, ο μυελός των οστών (bone marrow-BM) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα BM-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί σε ζωικά πρότυπα σήψης, ηπατικής, καρδιακής ή νεφρικής ανεπάρκειας καθώς και σε προκλινικές δοκιμές με αξιοσημείωτα αποτελέσματα²². Εντούτοις, ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός εναλλακτικών πηγών αξιοποιήσιμων MSCs είναι μεγάλης σπουδαιότητας. Τελευταίες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε MSCs που προέρχονται από εμβρυϊκές πηγές, όπως το αμνιακό υγρό (amniotic fluid - AF), ο ομφάλιος λώρος (umbilical cord - UC), ο πλακούντας (Placenta - P) ή οι αμνιακές μεμβράνες (amniotic membrane - AM)^{14,23,24}.

Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωσή των MSCs βασίζονται στην ικανότητά τους: (α) να προσκολλώνται σε καλλιεργητικές επιφάνειες, (β) να πολλαπλασιάζονται *in vitro* σε βασικό καλλιεργητικό μέσο, (γ) να δημιουργούν αποικίες με ινοβλαστική μορφή και (δ) να έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα²⁵. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί ως προς τον πλήρη χαρακτηρισμό των ετερογενών αυτών πληθυσμών που σχετίζονται με την απουσία ταυτοποιημένων επιφανειακών δεικτών, ειδικών για τα κύτταρα αυτά^{26,27}. Τα MSCs είναι ένας διακριτός πληθυσμός από τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, καθώς δεν εκφράζουν τα μόρια επιφανείας CD14, CD34, και CD45 (δείκτης των αιμοποιητικών κυττάρων)²⁸. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός τους βασίζεται στην έκφραση ενός συνόλου δεικτών όπως το μόριο Stro-1, το οποίο εκφράζεται στα μη αιμοποιητικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών²⁹, τα αντιγόνα επιφανείας CD105 (ενδογλίνη) και CD73, το μόριο CD166 (ALCAM) καθώς και τα μόρια CD90/Thy-1, CD44 και CD29 (β1-ιντεγκρίνη)^{13,30,31}.

Ενήλικες Πηγές MSCs

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη πηγή MSCs είναι ο μυελός των οστών. Όμως, MSCs έχουν απομονωθεί επίσης και από άλλους ενήλικους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός^{32,33}, το τριχωτό της κεφαλής³⁴, το δέρμα³⁵, ο μυϊκός ιστός³⁶, ο συνδετικός ιστός, τα περικύτταρα³⁷, η αρθρική μεμβράνη³⁸, το περιόστεο³⁹ και το περιφερικό αίμα⁴⁰. Παρ' όλη τη φαινοτυπική ομοιογένεια, τα κύτταρα αυτά ενδεχομένως να παρουσιάζουν ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης, γεγονός που σχετίζεται με την πηγή προέλευσής τους³⁰.

MSCs του μυελού των οστών (BM-MSCs)

Τα BM-MSCs παρέχουν στρωματική υποστήριξη και κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τον πολλαπλασιασμό

και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ συγχρόνως δίνουν γένεση στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων και στα κύτταρα του οστίτη ιστού^{41,42}. Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα (0,001-0,01%) του συνολικού πληθυσμού των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών²⁰. Τα ανθρώπινα BM-MSCs απομονώνονται συνήθως από τη στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, που προκύπτει μετά από επιστοιβασία δείγματος του μυελού σε φικόλη, ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση⁴³. Εντούτοις, ένα μείζον πρόβλημα της απομόνωσης των MSCs από το μυελό των οστών είναι το γεγονός ότι ο αριθμός αυτών μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας του δότη, ενώ τα κύτταρα που απομονώνονται έχουν περιορισμένο δυναμικό έκπτυξης και διαφοροποίησης και βραχύτερο χρόνο ζωής, σε σχέση με τα MSCs που προέρχονται από εμβρυϊκές πηγές. Επίσης, η διαδικασία λήψης μυελού των οστών είναι αρκετά επίπονη για το δότη, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη της αναζήτησης νέων εναλλακτικών πηγών MSCs για αυτόλογη ή αλλογενή θεραπευτική χρήση.

Εμβρυϊκές πηγές MSCs

Τα τελευταία χρόνια τα εμβρυϊκά (fetal) μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (fMSCs), αποτελούν ένα πληθυσμό πολυδύναμων (multipotent) κυττάρων τα οποία έχουν τη δυνατότητα να απομονωθούν και να εκπτυχθούν εύκολα στην καλλιέργεια. Οι μέχρι τώρα *in vivo* και *in vitro* πειραματικές προσεγγίσεις έχουν δείξει ότι τα fMSCs, οντολογικά βρίσκονται ανάμεσα στα εμβρυονικά (ES) και τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (adult stem cells). Τα εμβρυϊκά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (fMSCs) έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως το αμνιακό υγρό, ο ομφάλιος λώρος, ο πλακούντας, το αίμα του ομφάλιου λώρου, οι εμβρυϊκές μεμβράνες (άμνιον, χόριον) ή το έλυτρο του Wharton¹². Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά, ανάλογα με την πηγή προέλευσης, εμφανίζουν την ικανότητα διαφοροποίησης *in vitro* σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων όπως ηπατοκύτταρα, μυϊκά ή νευρικά κύτταρα¹². Επίσης δεν σχηματίζουν τερατώματα σε *in vivo* ανοσοκατασταλμένα ζωικά μοντέλα και χαρακτηρίζονται από σταθερό καρύοτυπο κατά τις *in vitro* διαδικασίες έκπτυξης και καλλιέργειας. Επιπροσθέτως, εμφανίζουν σημαντική ικανότητα αναγέννησης κατεστραμμένων ιστών, εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες και άλλα μόρια τα οποία ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες¹². Τέλος, σημαντική είναι και η χαμηλή ανοσογονικότητα που παρουσιάζουν, γεγονός που ενισχύει την πιθανή χρήση τους σε πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας. Αυτά τα ιδιάζοντα χαρακτηριστικά, καθιστούν τα MSCs ένα ελκυστικό

εργαλείο για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών κυτταρικής θεραπείας σε κλινικές εφαρμογές¹⁴.

Πηγές εμβρυϊκών MSCs αποτελούν:

Το έλυτρο του Wharton (UC-MSCs)

Πηγή MSCs αποτελεί και το έλυτρο του Wharton (Wharton Jelly- WJ), το οποίο συνιστά το συνδετικό ιστό που περιβάλλεται από τις δύο αρτηρίες και τη μία φλέβα του ομφαλίου λώρου^{12,44}. Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα UC-MSCs εκφράζουν τους δείκτες που χαρακτηρίζουν τα MSCs και επιπρόσθετα, εκφράζουν τους δείκτες βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog⁴⁵. Τα UC-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vitro* προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και νευρικά κύτταρα⁴⁶⁻⁴⁸.

Ο πλακούντας (pMSCs)

Η απομόνωση των MSCs του πλακούντα (pMSCs) πραγματοποιείται από τις χοριακές λάχνες μετά από ειδική επεξεργασία⁴⁹. Τα pMSCs εκφράζουν τους MSCs δείκτες και δείκτες πολυδυναμικότητας όπως οι SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 και TRA-1-81^{50,51}. Επίσης, έχειδειχτεί ότι τα pMSCs εκκρίνουν κυτοκίνες όπως οι IL-1Ra, IL6, IL8, IL10, IL11 και IL15 και ότι παρουσιάζουν την ικανότητα να μεταναστεύουν προσελκόμενα από χημειοτακτικά μόρια όπως τα SDF-1, PDGF, HGF και MCP-1⁴⁹.

Η αμνιακή μεμβράνη (AM-MSCs)

Τα MSCs της αμνιακής μεμβράνης προέρχονται από το αμνιακό επιθήλιο και τα αμνιακά μεσεγχυματικά στρώματα, αντίστοιχα^{13,44}. Τα AM-MSCs διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες με τα MSCs που προέρχονται από ενήλικες πηγές⁵². Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα AM-MSCs εκτός από τους MSCs δείκτες εκφράζουν και τον δείκτη βλαστικότητας Oct-3/4¹³.

Το αμνιακό υγρό (AF-MSCs)

Το αμνιακό υγρό αποτελεί μια εναλλακτική εμβρυϊκή πηγή πλούσια σε MSCs. Η συχνότητα των κυττάρων αυτών προσεγγίζει το 0,9 - 1,5% όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αμνιακού υγρού^{53,54}. Πρόσφατα, από την ερευνητική μας ομάδα και άλλες ομάδες, πραγματοποιήθηκε α) επιτυχής απομόνωση δύο διακριτών AF-MSC πληθυσμών^{8,10,54-56}, β) συστηματικός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και εκτίμηση του φάσματος διαφοροποίησης τους⁵⁶⁻⁵⁸ καθώς και γ) ανάλυση για πρώτη φορά του πρωτεομικού τους προτύπου^{56,57}. Τα AF-MSCs εκφράζουν μόρια επιφανείας χαρακτηριστικά των MSCs, δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς δείκτες ενώ εκφράζουν τους παράγοντες βλαστικότητας Sox2, Nanog, SSEA-4, Oct-3/4, Klf4 και c-Myc. Τα AF-MSCs είναι πολυδύναμα, με υψηλό ρυθ-

μό πολλαπλασιασμού, ευρύ φάσμα διαφοροποίησης και φυσιολογικό καρύοτυπο μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες¹⁴. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ανάλυση και αξιοποίηση του προτύπου έκφρασης των microRNAs όλων των πληθυσμών MSCs με σκοπό την κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζουν τις διαδικασίες διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών⁵⁹.

Βασικά κριτήρια για τη χρήση των MSCs στην αναγεννητική ιατρική

Ο αριθμός, οι ιδιότητες, το δυναμικό διαφοροποίησης, ο τρόπος απομόνωσης και έκπτυξης των MSCs προερχόμενων από ενήλικες ή εμβρυϊκές πηγές θα πρέπει να ελέγχονται ενδελεχώς πριν την πιθανή χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική⁶⁰. Ο Gimble και συν⁶⁰⁻⁶² πρότειναν ότι η χρήση των βλαστικών/πρόδρομων κυττάρων στην Κυτταρική Θεραπεία και Αναγεννητική Ιατρική θα πρέπει να ικανοποιεί τα ακόλουθα προαπαιτούμενα.

Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα θα πρέπει:

1. Να είναι διαθέσιμα σε μεγάλο αριθμό (10^6 - 10^9 κύτταρα).
2. Να μπορούν να απομονωθούν με τη λιγότερο επίπονη μέθοδο.
3. Να έχουν μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης σε πολλαπλές σειρές.
4. Να μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς σε αυτόλογες ή αλλογενείς μεταμοσχεύσεις.
5. Να είναι η δυνατή η χρήση τους σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές ορθής παρασκευαστικής πρακτικής (Good Manufacturing Practice guidelines).

Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα μέχρι τώρα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη χρήση των MSCs σε διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Εμβιομηχανική ιστών

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε εφαρμογές που στηρίζονται σε μεταμόσχευση βλαστικών ή πρόδρομων κυττάρων μέσω ικρίωμάτων⁶³. Τα ικρίωματα, συνήθως κατασκευάζονται από φυσικά ή συνθετικά υλικά με ποικίλες βιοδραστικές και μηχανικές ιδιότητες και παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον για την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση καθώς και την οργανογένεση. Είναι φανερό πως ο τύπος των κυττάρων μαζί με την επιλογή του κατάλληλου βιοϋλικού είναι θεμελιώδους σημασίας για το αποτέλεσμα της εν λόγω θεραπείας⁶³.

Έχουν προταθεί και εφαρμοστεί τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τρόποι για τη χρήση MSCs σε ικρίωματα. Στην πρώτη μέθοδο τα MSCs προσδένονται στα ικρίωματα *in vitro*, και μετά από μία σύντομη επώαση για να διασφαλιστεί η επιτυχής πρόσδεση, εμφυτεύονται στην

περιοχή της ιστικής βλάβης⁶⁴. Κατά τη δεύτερη μέθοδο, το ικρίωμα με τα κύτταρα επωάζονται σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει τη διαφοροποίηση προς συγκεκριμένες κυτταρικές προβαθμίδες (κυρίως πρόδρομα οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα) και μετά την πάροδο 7-14 ημερών εμφυτεύεται στην προκαθορισμένη θέση βλάβης του ιστού ή οργάνου^{22,64}. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μαζί με το ικρίωμα περιλαμβάνονται σε προστατευτικά «καλύμματα» (π.χ. υδρογέλη - hydrogel) επιτρέποντας έτσι την ωρίμανση του ικρίωματος *in vivo*⁶⁴. Οι προσεγγίσεις αυτές έχουν εκτενώς περιγραφεί σε διάφορα ζωικά πρότυπα, πλην όμως η κλινική τους εφαρμογή στον άνθρωπο είναι περιορισμένη και βρίσκεται ακόμη στο στάδιο των προκλινικών μελετών^{16,64}.

Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, έχει μελετηθεί η καλλιέργεια τους σε ιστοειδικά ικρίωματα και η μετέπειτα εμφύτευσή τους σε περιοχές του προς αποκατάσταση ιστού⁶⁴. Προκλινικές μελέτες σε τρωκτικά, σκύλο και στον άνθρωπο έχουν δείξει πως η χρήση αυτόλογων BM-MSCs τοποθετημένων σε πορώδες κεραμικό φωσφορικού ασβεστίου οδηγεί στην αποκατάσταση καταγμάτων μακρών οστών⁶⁴. Ομοίως, ικρίωματα υαλουρονικού οξέος και πολυμερών που φέρουν BM-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση χόνδρου⁶⁵. Ο De Coppi και συν. έδειξαν πως AF-MSCs εμφυτευμένα σε ικρίωμα μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vivo* σε οστεοκύτταρα και να οδηγήσουν στην αποκατάσταση οστού σε ανοσοκατασταλμένο ζωικό πρότυπο (NOD/SCID)⁸.

Παρακρινής δράση των MSCs

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός μελετών έχει εστιαστεί στην ανάλυση του ρόλου της παρακρινούς δράσης των MSCs⁶⁶. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων για τη μελέτη του εκκριτώματος και την ανάλυση της ταυτότητας των εκκρινόμενων βιοδραστικών παραγόντων των MSCs συλλέγεται καλλιεργητικό μέσο στις 24 ή 48h και εφαρμόζονται μέθοδοι πρωτεομικής, ELISA ή μικροσυστοιχιών⁶⁴. Η ποσότητα και η ποιότητα των βιοδραστικών παραγόντων ποικίλλει από δότη σε δότη και επίσης διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την πηγή απομόνωσης των MSCs.

Αυτά τα αποτελέσματα, ενδεχομένως να οδηγήσουν σε καινοτόμες θεραπευτικές προσπελάσεις, που θα συμβάλουν ενεργά στην αναγέννηση ή την επιδιόρθωση ιστών. Πιο συγκεκριμένα, σε μοντέλο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε αρουραίο, η μεταμόσχευση αλλογενών MSCs είχε ευεργετικά αποτελέσματα μέσω παρακρινούς δράσης και οδήγησε στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας τέσσερις εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση⁶⁷. Επίσης, η έκθεση ενδοθηλιακών κυττάρων σε

εκκρίωμα των MSCs έδειξε ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση τους *in vitro* με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο μέσω του VEGF και bFGF που αποτελούν βασικούς παράγοντες εμπλεκόμενους στη διαδικασία αυτή⁶⁷. Μια πρόσθετη επιβεβαίωση του θεραπευτικού ρόλου του εκκρίωματος των MSCs έχει επίσης αναφερθεί σε προκλινικό μοντέλο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, όπου η μεταμόσχευση κυττάρων οδήγησε σε βελτίωση του φαινοτύπου, μέσω παρακρινικών επιδράσεων που επηρεάζουν τις φλεγμονώδεις, αγγειακές και αποπτωτικές/νεκρωτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την ισχαιμική ανεπάρκεια των νεφρών. Δείχθηκε πως τα μεταμοσχευμένα MSCs δεν διαφοροποιούνται σε ώριμα σωληνοειδή ή ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η έκφραση προ-φλεγμονωδών μορίων, όπως IL-1β, TNF-α, IPN-γ μειώθηκε σημαντικά στα νεφρά, με ταυτόχρονη επαγωγή των αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως IL-10, bFGF, TOP-α, και Bcl-2⁶⁸.

Στο πλαίσιο αυτό, η ερευνητική μας ομάδα έδειξε ότι τα AF-MSCs μπορούν, με τους παράγοντες που εκκρίνουν, να επιταχύνουν την ιστική επιδιόρθωση σε ανοσοκατασταλμένο ζωικό πρότυπο οξείας ηπατικής ανεπάρκειας (ΟΗΑ). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παρακρινική δράση των κυττάρων αυτών στη θεραπεία της ΟΗΑ όπου, αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως είναι η ιντερλευκίνη-10 (IL-10), καθώς και αυξητικούς παράγοντες, που παίζουν ρόλο στην ιστική επιδιόρθωση, γεγονός που συνέβαλε στη βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας⁶⁹. Σε παράλληλη μελέτη, δείξαμε ότι τα AF-MSCs έχουν τη δυνατότητα μέσω εκκρινόμενων βιοδραστικών ουσιών να προωθήσουν την αγγειογένεση *in vivo*⁷⁰.

Είναι επίσης γνωστό ότι το εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον των MSCs είναι πλούσιο σε διαλύματα πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών, καθώς και κυστίδια που περιέχουν πρωτεΐνες, mRNAs, και miRNAs⁶⁷. Πρόσφατες μελέτες προσδιορίζουν την απελευθέρωση των μικροκυστιδίων (microvesicles-MVs) και εξωσωμάτων (exosomes) ως ένα παρακρινή μηχανισμό των MSCs. *In vivo* πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι τα εκκρινόμενα MVs από τα BM-MSCs επιταχύνουν τη μορφολογική και λειτουργική ανάκτηση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια SCID, με επαγωγή του πολλαπλασιασμού των σωληνοειδών κυττάρων, και βοηθούν με τον τρόπο αυτό την επιβίωση των ζώων⁷¹.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι το ευεργετικό αποτέλεσμα που παρατηρείται σε προκλινικά μοντέλα καρδιακής ισχαιμίας μετά από μεταμόσχευση MSCs, θα μπορούσε να οφείλεται κυρίως στα εκκρινόμενα MVs⁶⁷. Τα MVs και τα εξωσώματα που εκκρίνονται από MSCs δοκιμάζονται σήμερα σε αρκετά άλλα προκλινικά μοντέλα με βλάβες, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, η ηπατική ίνωση, οι ρευματικές παθήσεις, και η οξεία πνευμονική ανεπάρκεια⁶⁷.

Αναγέννηση μικροπεριβάλλοντος

Η εγγενής εκκριτική δραστηριότητα των MSCs είναι δυνατό να συντελεί στην αναγέννηση του μικροπεριβάλλοντος του ιστού στις περιοχές βλάβης ή τραυματισμού. Αρχικά, η ιδιότητα αυτή των MSCs δοκιμάστηκε στο πλαίσιο της θεραπείας του καρκίνου συγχորηγώντας ανθρώπινα MSCs κατά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ασθενείς, που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία/ακτινοβολία με στόχο τη μετανάστευση και τον εποικισμό των MSCs στο στρώμα του μυελού των οστών και την επακόλουθη αναγέννηση αυτού⁶⁴.

Πληθώρα πειραμάτων βασίζονται στη χρήση αλλογενών ή αυτόλογων MSCs με στόχο την αναγέννηση του μικροπεριβάλλοντος των ιστών, μέσω της ενεργοποίησης των ενδογενών βλαστικών ή των πρόδρομων κυττάρων⁶⁴. Εντούτοις, ο λεπτομερής μηχανισμός δράσης των MSCs δεν είναι σαφής.

Από τις αρχές της δεκαετίας, πειραματικές και προκλινικές μελέτες εστιάζονται στην επίδραση των BM-MSCs στην αναγέννηση του καρδιακού ιστού μετά από καρδιακό έμφραγμα/ισχαιμία⁷² ή της ισχαιμίας, η οποία αποτελεί απότοκο εγκεφαλικού επεισοδίου⁷³. Παράλληλα, MSCs ενηλίκων και εμβρυϊκών πηγών έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση μηνίσκων και τενόντων και την επούλωση πληγών⁶⁴. Επιπλέον, από την ομάδα μας μελετήθηκε λεπτομερώς ο ενδεχόμενος ρόλος των AF-MSCs στην επούλωση τραυμάτων³¹.

Ο μηχανισμός δράσης, που διέπει όλες αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται να είναι ο ίδιος: τα MSCs εκκρίνουν βιοδραστικούς παράγοντες που αναστέλλουν την απόπτωση, ενισχύουν την κυτταρική μετανάστευση, προωθούν την αγγειογένεση, και αυξάνουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστικών ή προγονικών κυττάρων που βρίσκονται στον ιστό. Το πολύπλοκο αυτό φαινόμενο που προκαλείται από την εκκριτική δραστηριότητα των MSCs αναφέρεται και ως “τροφική δραστηριότητα”⁶⁴.

Ανοσορρύθμιση

Καλλιεργητικό μέσο προερχόμενο από BM-MSCs ευρισκόμενα σε φάση ανάπτυξης έχει ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες σε δοκιμασία μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης⁶⁴. Αυτή η ανοσορρυθμιστική επίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων επιδρώντας ανασταλτικά στην παραγωγή του TNF-α και INF-γ και ως εκ τούτου, οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων της IL-10. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα BM-MSCs, παρουσία του φαρμάκου bortezomib, έχουν θεραπευτική δράση σε *in vivo* προκλινικό μοντέλο ρευματοειδούς αρθρίτιδας⁷⁴.

Αν και οι ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις των εκκρινόμενων παραγόντων των MSCs δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί επαρκώς, τα διαθέσιμα μέχρι τώρα δεδομένα

υποστηρίζουν ότι τα αλλογενή MSCs μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες λόγω της χαμηλής ανοσογονικότητάς τους⁶⁴. Σε αυτό το πλαίσιο, η Osiris Therapeutics, Inc. προχώρησε σε κλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας αλλογενή MSCs για τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) και της νόσου του Crohn⁶⁴. Ανάλογο πλεονέκτημα λόγω χαμηλής ανοσογονικότητας παρουσιάζουν και τα fMSCs¹⁴. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα AF-MSCs εμποδίζουν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και επίσης εκκρίνουν παράγοντες με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση όπως η GRO, η MCP και η IL-6¹⁴.

Προοπτικές

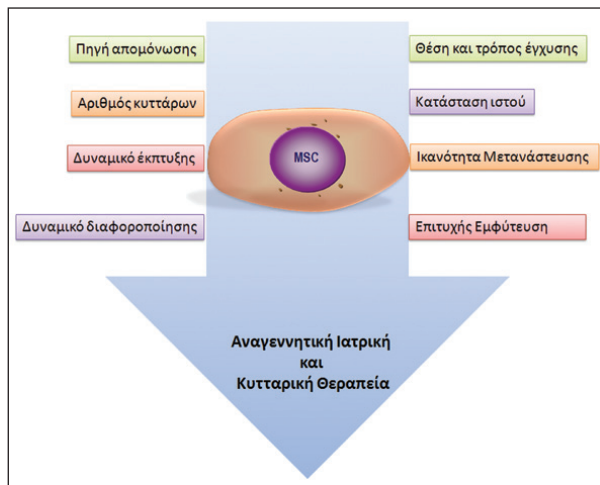
Αν και η λεπτομερής μελέτη των ιδιοτήτων των MSCs συνεχίζεται τα τελευταία 20 χρόνια, μόνον πρόσφατα έχουν τεκμηριωθεί οι δυνατότητες τους για την κλινική χρήση. Οι ιδιότητες των MSCs τα καθιστούν σημαντικά εργαλεία για την αποκατάσταση της βλάβης των ιστών ή για την αναγέννηση και επανόρθωση του μικροπεριβάλλοντος του ιστού. Εντούτοις, παράγοντες όπως η ηλικία του ασθενούς, το μέγεθος της βλάβης, η επάρκεια, η πηγή προέλευσης και ο αριθμός των MSCs παίζουν σημαντικό ρόλο στο θεραπευτικό αποτέλεσμα (Εικόνα 1). Είναι φανερό πως οι μηχανισμοί που διέπουν την ανοσορρύθμιση και την παρακρινή δράση των MSCs είναι διαφορετικοί από εκείνους που συμμετέχουν στη μηχανική των ιστών και την αντικατάσταση οργάνων. Είναι αξιοσημείωτο πως ανάλυση δεδομένων από κλινικές μελέτες σε ασθενείς παγκοσμίως έδειξε πως περισσότερες από 4500 θεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζονται στη χρήση θεραπευτικών βλαστικών κυττάρων, εκ των οποίων οι 470 σχετίζονται με MSCs (Clinical Trials.gov, June 2014).

Οι απόψεις στη διεθνή επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις θεραπευτικές δυνατότητες των MSCs διίστανται. Πολλοί θεωρούν ότι τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ξεχωριστές ιδιότητες που τα καθιστούν χρήσιμα στην κλινική πράξη^{22,64,75-77}, ενώ άλλοι προσομοιάζουν τα MSCs απλά με ινοβλάστες¹⁶. Σε κάθε περίπτωση, το σημερινό επίπε-

δο γνώσεων, τόσο στην Ελλάδα όσο διεθνώς, στο πεδίο των μεσεγχυματικών κυττάρων υστερεί σε ότι αφορά τα παρακάτω σημεία¹⁶:

- 1) την επαρκή κατανόηση της βασικής βιολογίας των κυττάρων αυτών,
- 2) τον καθορισμό του ακριβούς φαινοτύπου και της μορφολογίας των MSCs,
- 3) τους μηχανισμούς που ελέγχουν την *in vivo* διαφοροποίηση, μετανάστευση και εποικισμό στους διάφορους ιστούς
- 4) την επαρκή έκπτυξη και διαθεσιμότητά τους για τη μελλοντική χρήση στην κλινική πράξη και
- 5) τον μηχανισμό δράσης τους

Πριν είναι εφικτή η κλινική χρήση των MSCs, απαιτείται να απαντηθούν επαρκώς τα ανωτέρω σημεία. Απαραίτητες προϋποθέσεις για το σκοπό αυτό είναι η κατανόηση της βιολογίας των κυττάρων αυτών και η έκπτυξη των κυτταρικών πληθυσμών από γνωστές ή νέες πηγές χρησιμοποιώντας αξιόπιστες και αναπαραγωγίμες *in vitro* και *in vivo* μεθοδολογίες¹⁶.



Εικόνα 1. Παράγοντες που θεωρούνται σημαντικοί για να είναι δυνατή η χρήση των MSCs στην Αναγεννητική Ιατρική και Κυτταρική Θεραπεία.

Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine

by Maria G. Roubelakis¹, Nicholas P. Anagnostou²

¹Laboratory of Biology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece, ²Cell and Gene Therapy Laboratory, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece

ABSTRACT: The concept of Regenerative Medicine combined with Cell based Therapy and Tissue Engineering represents the forth pillar of healthcare and provides a promising approach for the treatment of serious diseases. Recently, cell based therapies have been focused on the use of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). Human MSCs represent a mesoderm derived population of progenitors that are

easily expanded in culture. They are capable to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes and exhibit the potential to repair or regenerate damaged tissues. The best characterized source of human MSCs to date is the bone marrow (BM); recently, fetal sources, such as amniotic fluid (AF), umbilical cord (UC), amniotic membranes (AM) or placenta have also attracted increased attention. Thus, MSCs may represent a valuable tool for Tissue Regeneration and Cell Therapy. To this end, the main focus of this review is to summarize and evaluate the key characteristics, the sources and the potential use of MSCs in therapeutic approaches and modalities.

Βιβλιογραφία

- Mason C, Brindley DA, Culme-Seymour EJ, Davie NL. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen Med.* 2011;6:265-272.
- Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:179-184.
- Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2008;4:3-11.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-884.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17:331-340.
- Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface.* 2010;7 Suppl 6:S689-706.
- Campagnoli C, Bellantuono I, Kumar S, Fairbairn LJ, Roberts I, Fisk NM. High transduction efficiency of circulating first trimester fetal mesenchymal stem cells: potential targets for in utero ex vivo gene therapy. *BJOG.* 2002;109:952-954.
- De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25:100-106.
- Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells.* 2009;27:1142-1151.
- In ,t Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548-1549.
- Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev.* 2011;19:1449-1470.
- Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009;4:423-433.
- Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int.* 2012;2012:107836.
- Trohatou O, Anagnou NP, Roubelakis MG. Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8:125-132.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:215-230.
- Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19:35-42.
- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466:829-834.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131:324-336.
- Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE.* 2005;2005:pe37.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-98.
- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 2013;4:201.
- Roubelakis MG. Therapeutic potential of fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8:115-116.
- Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells.* 2014;6:195-202.
- Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M, et al. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Vet Res Commun.* 2007;31 Suppl 1:1-8.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5:91-116.
- Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:262-271.
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 2007;137:491-502.
- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78:55-62.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differ-

- entiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-2749.
31. in, t Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003;88:845-852.
 32. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009;4:265-273.
 33. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46:219-228.
 34. Shih DT, Lee DC, Chen SC, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 2005;23:1012-1020.
 35. Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*. 2005;14:337-348.
 36. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1998;16:155-162.
 37. Diefenderfer DL, Brighton CT. Microvascular pericytes express aggrecan message which is regulated by BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:172-178.
 38. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1928-1942.
 39. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*. 2001;44:85-95.
 40. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004;89:1421-1427.
 41. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*. 2007;25:69-77.
 42. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002;12:502-508.
 43. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3213-3218.
 44. Bitsika V, Vlahou A, Roubelakis MG. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013;8:133-143.
 45. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:8.
 46. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24:115-124.
 47. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21:50-60.
 48. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22:1330-1337.
 49. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21:158-163.
 50. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G, Jr., Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol*. 2006;419:426-438.
 51. Pipino C, Shangaris P, Resca E, et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br Med Bull*. 2013;105:43-68.
 52. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. 2007;75:91-96.
 53. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica*. 2008;93:339-346.
 54. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 2004;19:1450-1456.
 55. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*. 2003;18:1489-1493.
 56. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16:931-952.
 57. Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D, et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;15:1896-1913.
 58. Zagoura DS, Trohatou O, Bitsika V, et al. AF-MSCs fate can be regulated by culture conditions. *Cell Death Dis*. 2013;4:e571.
 59. Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, et al. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:54-68.
 60. Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297:98-110.
 61. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3:705-713.
 62. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-1260.
 63. Saffinia L, Datan N, Hohse M, Mantalaris A, Bismarck A. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:7537-7547.

64. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213:341-347.
65. Solchaga LA, Penick KJ, Welter JF. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods Mol Biol.* 2011;698:253-278.
66. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: Insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013.
67. Bollini S, Gentili C, Tasso R, Cancedda R. The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome. *J Clin Med.* 2013;2:302-327.
68. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289:F31-42.
69. Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, et al. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut.* 2012;61:894-906.
70. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnou NP, Watt SM. Spindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One.* 2013;8:e54747.
71. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1053-1067.
72. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362:697-703.
73. Li Y, Chen J, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 2005;49:407-417.
74. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in pre-clinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1733-1740.
75. Fibbe WE, Dazzi F, LeBlanc K. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:812-813.
76. Phinney DG, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Shi Y, Sensebe L. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:812.
77. Pittenger MF. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:811.