

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Η χρήση των βλαστικών κυττάρων στη δημιουργία μοντέλων τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών

Τα τελευταία 20 έτη υπάρχει μια αλματώδης ανάπτυξη στις τεχνικές καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων, που απομονώνονται από ανθρώπινα έμβρυα (hESCs) ή από ενήλικες ανθρώπους. Η βελτιστοποίηση των συγκεκριμένων τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας καθιστά πλέον τα παραπάνω κύτταρα ευρέως διαθέσιμα. Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε πλειοδύναμα (pluripotent) και πολυδύναμα (multipotent). Το δυναμικό διαφοροποίησης που τα χαρακτηρίζει (pluri-/multipotency), τα καθιστά «τα πλέον ειδικά» για χρήση σε *in vitro* δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, καθώς και αναπτυξιακής τοξικότητας. Οι έρευνες πλέον προσανατολίζονται τόσο στην ανακάλυψη νέων, όσο και στην εξέλιξη των ήδη υπάρχουσών τεχνικών τοξικότητας. Πιστεύεται ότι το αποτέλεσμα αυτών των ερευνών θα συμβάλει στην καλύτερη αξιολόγηση των χημικών ουσιών και των φαρμάκων, αλλά και των επιπτώσεών τους στην ανάπτυξη του οργανισμού, γεγονός το οποίο είναι δύσκολο να διερευνηθεί στον άνθρωπο, αφού εγείρονται θέματα βιοηθικής. Επί πλέον, τα ανθρώπινα επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs), τα οποία προκύπτουν από τον επαναπρογραμματισμό των ώριμων σωματικών κυττάρων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες καταγραφής των διαφορετικών προδιαθεσικών παραγόντων κινδύνου πολλών ασθενειών, με τη δημιουργία *in vitro* κυτταρικών μοντέλων, που θα προέρχονται από διαφορετικά άτομα, καλύπτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα γενετικού πολυμορφισμού. Μέσω των επιστημών της Γενομικής, της Πρωτεομικής, της Μεταβολομικής και της Μεταγραφομικής μπορεί να χαρτογραφηθεί πλήρως το προφίλ των hESCs και iPSCs κυττάρων, καθώς επίσης και τα περίπλοκα βιοχημικά μονοπάτια της φυσιολογικής τους απόκρισης σε φάρμακα. Συμπερασματικά, η ολοένα και αυξανόμενη χρήση των βλαστικών κυττάρων σε *in vitro* μελέτες της τοξικότητας θα πρέπει να στοχεύει (α) στην ελάττωση χρήσης των ζώων, (β) στην καλύτερη αξιολόγηση των κινδύνων και της πρόβλεψης της βιολογικής απόκρισης στις φαρμακευτικές ουσίες και (γ) στη μείωση του κόστους παραγωγής των φαρμάκων.

1. ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ως «βλαστικό κύτταρο» χαρακτηρίζεται ένα κύτταρο που φέρει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Πρώτον, θα πρέπει να έχει ικανότητα αυτο-ανανέωσης (self-renewal capacity). Αυτό σημαίνει πως όταν ένα βλαστικό κύτταρο περάσει στη φάση της μιτωτικής διαίρεσης, τότε θα δημιουργήσει είτε δύο ίδια βλαστικά κύτταρα (συμμετρική διαίρεση) είτε ένα κύτταρο πανομοιότυπο με τον εαυτό του και ένα διαφοροποιημένο (ασύμμετρη διαίρεση), το οποίο θα μεταναστεύσει στον ανάλογο ιστό ή όργανο. Δεύτερον, το κύτταρο θα πρέπει να έχει την ικανότητα δια-

φοροποίησης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (δυναμικό διαφοροποίησης) και, τρίτον, να μπορεί να ανασυνθέτει *in vivo* λειτουργικούς ιστούς¹ (εικ. 1).

Διακρίνονται διαφορετικοί τύποι βλαστικών κυττάρων, ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησής τους.¹ Έτσι, ξεχωρίζουμε τα πλειοδύναμα (pluripotent) κύτταρα, στα οποία ανήκουν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells) που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, καθώς επίσης και τα επαγόμενα πλειοδύναμα κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs), τα οποία σχηματίζονται με τη μέθοδο του επαναπρογραμματισμού των ώριμων σωματικών κυττάρων σε κύτταρα με τις

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2016, 33(1):8-21
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2016, 33(1):8-21

Κ. Κατσαούνου,
Ε. Τάκη,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

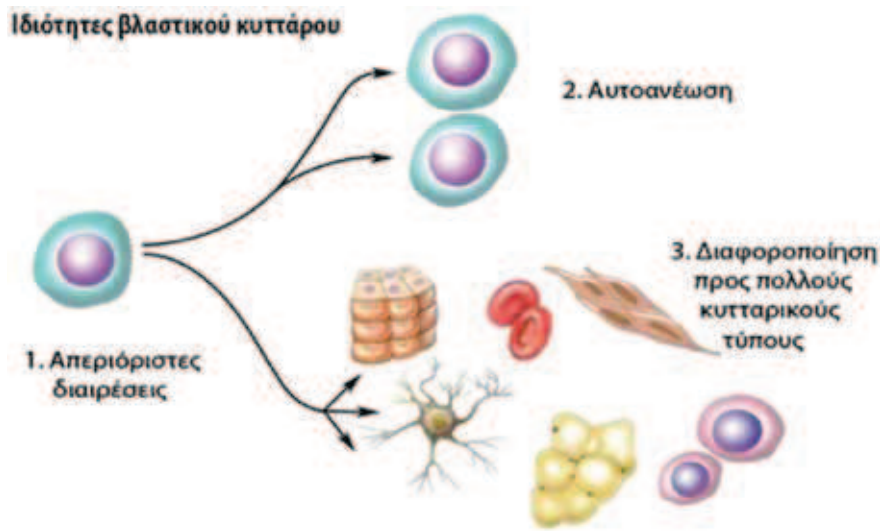
The use of stem cells
in the establishment
of drug toxicity models

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αναπτυξιακή τοξικότητα
Βλαστικά κύτταρα
Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs)
Επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs)
Κυτταροτοξικότητα
Μεσεγχυματικά κύτταρα της γέλης του Wharton (WJ-MSCs)

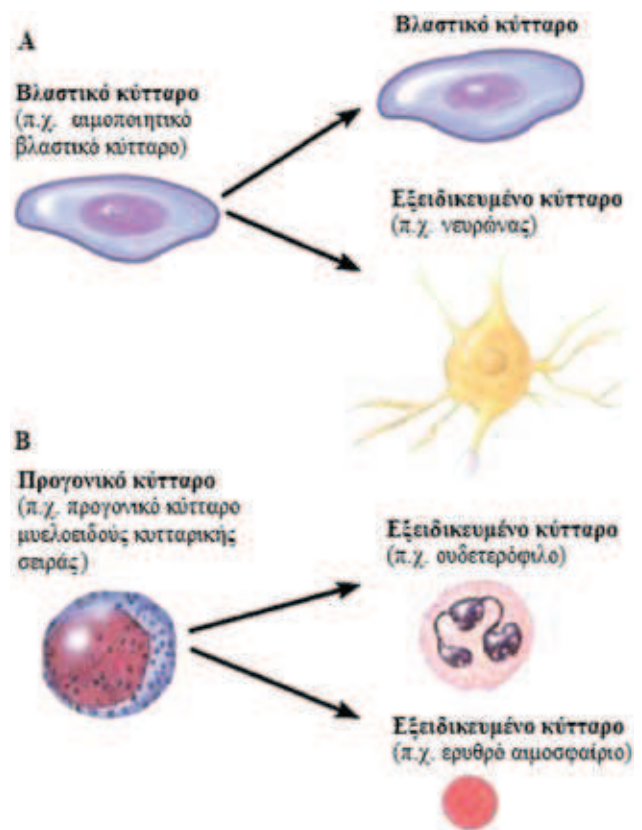
Υποβλήθηκε 21.4.2015
Εγκρίθηκε 1.5.2015



Εικόνα 1. Βασικά χαρακτηριστικά του βλαστικού κυττάρου. Το βλαστικό κύτταρο έχει την ικανότητα να αυτο-ανανεώνεται (self-renewal), να διαφοροποιείται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ιστού από τον οποίο προέρχεται (pluripotency) και να υφίσταται απεριόριστες διαιρέσεις.

ιδιότητες των βλαστικών. Τα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστούς που προέρχονται και από τις τρεις εμβρυϊκές βλαστικές στιβάδες, δηλαδή του ενδοδέρματος, του μεσοδέρματος και του εξωδέρματος. Σε αντίθεση με αυτά, τα πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα της αυτο-ανανέωσης, αλλά η ικανότητα διαφοροποίησής τους είναι περιορισμένη. Μπορούν να ωριμάσουν σε κύτταρα του ιστού ή του οργάνου από το οποίο προέρχονται και ο κύριος ρόλος τους είναι να τα συντηρούν και να τα επιδιορθώνουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων είναι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα λιπώδους ιστού, οστού και χόνδρου. Μια τρίτη κατηγορία βλαστικών κυττάρων είναι τα oligοδύναμα (oligopotent) ή μονοδύναμα (unipotent), τα οποία παράγονται και διαφοροποιούνται μέσα στους ιστούς. Η ονομασία τους προέρχεται από την ιδιότητά τους να μπορούν να σχηματίσουν τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα ενός μόνο ειδικού ιστού (ιστοειδικότητα). Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα oligοδύναμων βλαστικών κυττάρων, καθώς είναι ικανά να διαφοροποιηθούν τόσο σε μυελοειδή, όσο και σε λεμφοειδή κύτταρα (εικ. 2). Υπάρχουν επίσης μελέτες που απέδειξαν ότι τα κύτταρα των διακλαδώσεων του βρογχοκυψελιδικού αγωγού στους πνεύμονες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε βρογχικό επιθήλιο και σε κυψελιδικό επιθήλιο.²

Η δημόσια συζήτηση αναφορικά με τα βλαστικά κύτταρα έχει λάβει μεγάλες διαστάσεις σ' ό,τι αφορά στις εφαρμογές τους στην Αναγεννητική Ιατρική (regenerative medicine), τη χρήση τους στους τομείς της γονιδιακής και της κυτταρικής θεραπείας, καθώς και στη μελέτη της



Εικόνα 2. Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα υφίστανται δύο τύπους κυτταρικών διαιρέσεων, τη συμμετρική και την ασύμμετρη. Με τον πρώτο τύπο προκύπτουν δύο πανομοιότυπα θυγατρικά βλαστικά κύτταρα. Με τον δεύτερο τύπο κυτταρικής διαίρεσης προκύπτουν ένα βλαστικό και ένα προγονικό κύτταρο, με περιορισμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης (**A**). Τα προγονικά κύτταρα μπορούν να διέλθουν από διάφορους κύκλους κυτταρικών διαιρέσεων (ενδιάμεσοι προγονικοί τύποι) πριν από την τελική διαφοροποίηση σε ώριμο κύτταρο (**B**).

ανάπτυξης και εξέλιξης πολλών ασθενειών. Τα τελευταία έτη έχουν αναπτυχθεί ειδικές κυτταρικές σειρές βλαστοκυττάρων για συγκεκριμένες ασθένειες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη νέων φαρμάκων.³ Παρά το γεγονός ότι σημειώνεται πλέον σαφέστατη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί στη χρήση τους, οι οποίοι απορρέουν κυρίως από το γεγονός ότι (α) υφίστανται θέματα ηθικής φύσης στη χρήση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, καθώς η απομόνωσή τους προϋποθέτει την καταστροφή βλαστοκύστεων, (β) τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται όγκους στα ποντίκια (τερατώματα) και (γ) υπάρχουν προβλήματα που ανακύπτουν σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων λόγω έλλειψης ιστοσυμβατότητας.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΓΕΛΗΣ ΤΟΥ WHARTON (ΟΜΦΑΛΙΟΣ ΛΩΡΟΣ)

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο και ο πλακούντας συνδέονται με τον ελαστικό ομφάλιο λώρο (UC), ο οποίος περιέχει αιμοφόρα αγγεία. Οι ανταλλαγές ουσιών μεταξύ μητέρας-εμβρύου πραγματοποιούνται διά μέσου του πλακούντα και του ομφάλιου λώρου. Ο ομφάλιος λώρος σχηματίζεται από τμήμα του λεκιθικού σάκου και της αλλαντοϊκής μεμβράνης. Παράλληλα, ο ομφάλιος λώρος παρέχει προστασία στα αιμοφόρα αγγεία από τη συμπίεση, τη στρέψη και την κάμψη, εξασφαλίζοντας έτσι τη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος από και προς το έμβρυο. Ανατομικά, ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δύο αρτηρίες και μία φλέβα. Τα τρία αυτά αγγεία είναι ενσωματωμένα μέσα σε μια ειδική βλενώδη μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, που ονομάζεται γέλη του Wharton και καλύπτεται εξωτερικά από αμνιακό επιθήλιο. Η γέλη του Wharton περιέχει έναν πληθυσμό πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων στρώματος (MSCs), με μορφολογικά χαρακτηριστικά ινοβλαστών, που περιγράφονται με τον όρο WJ-hMSCs (Wharton jelly mesenchymal stem cells). Η προγενέστερη ονομασία τους ήταν «βλαστικά κύτταρα της μήτρας του ομφάλιου λώρου» (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs), έτσι ώστε να διαφοροποιούνται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία απομονώνονται από την ομφάλια φλέβα (human umbilical vein endothelial cells, hUVECs), καθώς και από τα MSCs που απομονώνονται από το ομφάλιο αίμα (umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs).⁴

Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί διάφοροι τύποι βλαστικών κυττάρων από τις παρακάτω διακριτές περιοχές: (α) Τον αμνιακό σάκο (από την εξωτερική επιθηλιακή στιβάδα και την εσωτερική υποαμνιακή μεσεγχυματική στιβάδα), (β)

τον χώρο της γέλης του Wharton (WJ), (γ) τον περιαγγειακό χώρο που περιβάλλει τα αγγεία, το υγρό και τον εξωτερικό χιτώνα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων του ομφάλιου λώρου, (δ) τον ενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό τοίχωμα των φλεβών) και (ε) τον αγγειακό χώρο (το αίμα που βρίσκεται μέσα στα αιμοφόρα αγγεία του ομφάλιου λώρου)⁵ (εικ. 3).

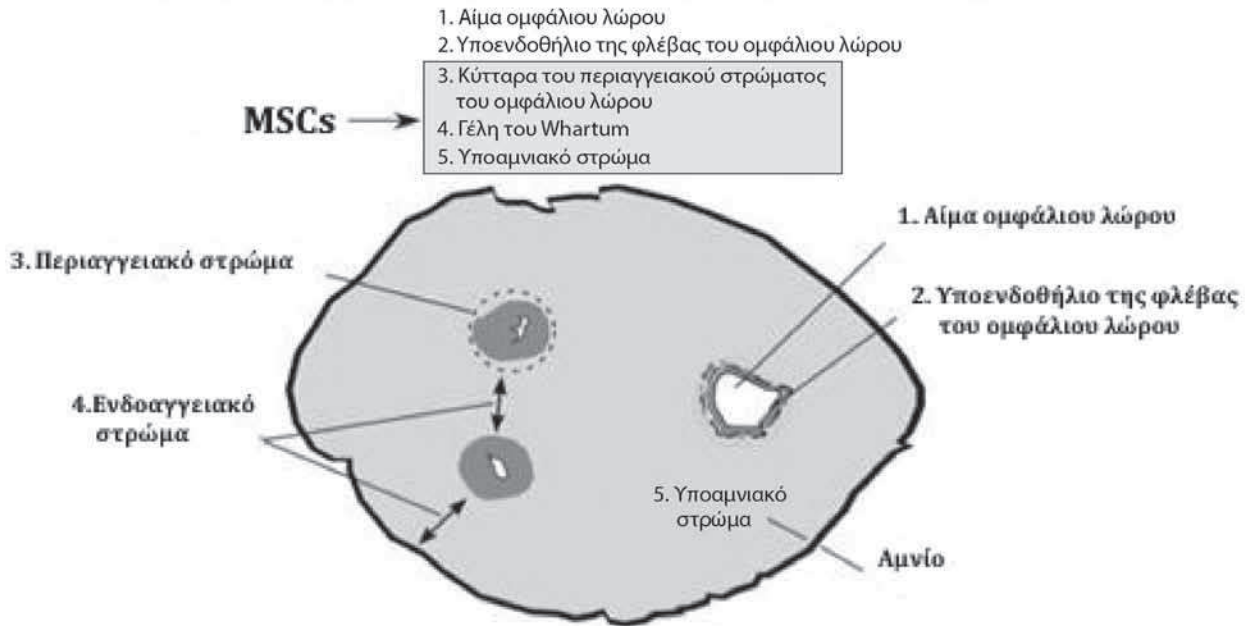
Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί όροι, όπως «υποαμνιακά», «ενδοαγγειακά», «περιαγγειακά» και «hUVEC» κύτταρα. Ωστόσο, η ακριβής ονοματολογία για τους εν λόγω τύπους κυττάρων δεν έχει οριστικοποιηθεί ακόμη. Επί πλέον, μέχρι στιγμής δεν έχουν τυποποιηθεί απόλυτα οι μέθοδοι απομόνωσης και η περιοχή ενδιαφέροντος για τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton στον άνθρωπο (από εδώ και στο εξής θα χρησιμοποιείται ο όρος WJ-hMSCs). Το γεγονός ότι δεν υπάρχει, ιστολογικά, σαφής διαχωρισμός μεταξύ των διαμερισμάτων, που περιγράφονται παραπάνω, δεν επιτρέπει την κατανόηση του αν οι απομονωμένοι πληθυσμοί βλαστοκυττάρων είναι ίδιοι ή διαφορετικοί. Επί πλέον, υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα απομόνωσης βλαστικών κυττάρων, γεγονός που συμβάλλει στην ακόμη μεγαλύτερη ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton. Τα WJ-MSCs μπορούν να απομονωθούν κυρίως από δύο περιοχές, την ενδοαγγειακή περιοχή και το υποάμνιο. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί και η απομόνωση WJ-MSCs από την περιαγγειακή ζώνη. Έχουν πραγματοποιηθεί δομικές, ανοσοϊστοχημικές και λειτουργικές *in vitro* αναλύσεις, οι οποίες έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων μεταξύ των τριών αυτών περιοχών. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι εν λόγω περιοχές μπορεί να προέρχονται από διαφορετικές προϋπάρχουσες δομές.⁶ Αξίζει να σημειωθεί ότι τα WJ-hMSCs τα οποία βρίσκονται κοντά στην αμνιακή επιφάνεια εμφανίζουν ενισχυμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ τα WJ-hMSCs που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με τα ομφάλια αγγεία εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα διαφοροποίησης.

3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΓΕΛΗΣ ΤΟΥ WHARTON

Η Διεθνής Επιτροπή για την Κυτταρική Θεραπεία (International Society for Cellular Therapy) έχει προτείνει τρία κριτήρια με τα οποία καθορίζεται ο μεσεγχυματικός-βλαστικός χαρακτήρας ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Τα MSCs πρέπει (α) να εμφανίζουν ιδιότητες πλαστικότητας και κυτταρικής προσκόλλησης, (β) να μην εκφράζουν ή να εκφράζουν, συγκεκριμένα, ειδικούς δείκτες επιφανείας

ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ MSCs



Εικόνα 3. Τυπική απεικόνιση της διαμόρφωσης του ομφάλιου λώρου στα θηλαστικά. Διακρίνονται οι διαφορετικές περιοχές: (α) Αίμα ομφάλιου λώρου, (β) υποενδοθήλιο της φλέβας του ομφάλιου λώρου, (γ) περιαγγειακό στρώμα, (δ) ενδοαγγειακό στρώμα, (ε) υποαμνιακό στρώμα.

(να είναι αρνητικά για τους CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD79a-, CD19- και τα 2ης τάξης αντιγόνα λευκοκυττάρων στον άνθρωπο [HLA] και θετικά για άλλα επιφανειακά αντιγόνα, όπως τα CD73+, CD29+, CD105+, CD90+) (πίν. 1) και (γ) σε *in vitro* δοκιμασίες θα πρέπει να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, καθώς και σε κύτταρα μυός, λιπώδους ιστού και τένοντα.

Το 2010, οι Kita et al⁷ έθεσαν τα θεμέλια για τον χαρακτηρισμό των κυττάρων της γέλης του Wharton, διαμορφώνοντας μια εικόνα του φαινοτυπικού προφίλ των βλαστικών κυττάρων που απομονώθηκαν από διαφορετικές περιοχές του ομφάλιου λώρου του ανθρώπου. Παρ’ όλα αυτά, η δυνατότητα ακριβούς προσδιορισμού των χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton που απομονώνονται από διαφορετικές περιοχές παρουσιάζει δυσκολίες εξ αιτίας της υψηλής ετερογένειας των κυτταρικών πληθυσμών κατά την απομόνωση, την καλλιέργεια και τις διαδικασίες ανάλυσής τους. Εν τούτοις, τα κύτταρα της γέλης του Wharton ικανοποιούν τα απαραίτητα κριτήρια για να χαρακτηρίζονται ως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ή κύτταρα στρώματος. Πιο συγκεκριμένα, (α) διαθέτουν ικανότητα προσκόλλησης, (β) είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα χόνδρου, λίπους και οστών και (γ) εκφράζουν τους παρακάτω δείκτες επιφάνειας: CD105+ (ενδογλίνης, SH2), CD73+ (SH3), CD90+ (Thy-1), HLA-A, B, C+ (MHC τάξης I), CD34, CD45-, HLA-DR- (MHC τάξης II).⁹ Είναι

Πίνακας 1. Η έκφραση των πρωτεϊνικών δεικτών επιφάνειας των WJ-MSCs. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα έχουν ληφθεί από *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων, μεταξύ της 1ης και της 9ης διέλευσης στην κυτταροκαλλιέργεια. Η κατηγοριοποίηση έγινε τόσο για να καθιερωθεί ένας μοριακός φαινοτυπικός προσδιορισμός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από τη γέλη του Wharton, όσο και για να υπάρχει ένας διαχωρισμός μεταξύ των εν λόγω κυττάρων και των υπολοίπων τύπων βλαστικών κυττάρων, καθώς και των ινοβλαστών. Οι δείκτες που είναι απαραίτητο να εκφράζονται στην επιφάνεια για να χαρακτηρίζονται τα κύτταρα ως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα είναι ο CD73, ο CD90 και ο CD105. Επί πλέον, είναι απαραίτητο να μην εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD34, CD45, καθώς επίσης και τους δείκτες CD14, CD19 και HLA-DR.

Μοριακός φαινότυπος μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton	
MJ-MSCs: Θετικοί κυτταρικοί δείκτες (επιφανειακά αντιγόνα)	MJ-MSCs: Αρνητικοί κυτταρικοί δείκτες (επιφανειακά αντιγόνα)
CD90	CD45
CD73	CD34
CD105	CD79A
CD44 (receptor of hyaluronic acid)	CD19
CD29/CD49e (integrin for fibronectin)	CD14
CD13	CD11B
CD54	CD140a (receptor of PDGF)
	HLADR

WJ-MSCs: Μεσεγχυματικά κύτταρα της γέλης του Wharton (Wharton jelly mesenchymal stem cells)

εντυπωσιακό ότι τα WJ-hMSCs, παράλληλα με τις ιδιότητες των μεσεγχυματικών κυττάρων, παρουσιάζουν και ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESCs). Συγκεκριμένα, τα WJ-hMSCs εκφράζουν τους δείκτες Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1 (σταδιο-ειδικό εμβρυϊκό αντιγόνο-1), SSEA-4, αλκαλική φωσφατάση, ενώ σχηματίζουν και *in vitro* «εμβρυοειδή σωματίδια». Επί πλέον, εκφράζουν τους δείκτες πλειοδυναμίας Oct-4, Sox-2 και Nanog. Η εν λόγω έκφραση παρουσιάζεται σε χαμηλότερα επίπεδα απ' ό,τι στα ESCs. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν με δοκιμασίες ποσοτικής qRT-PCR και μελέτες ανάλυσης μικροσυστοιχιών. Τα προαναφερθέντα δεδομένα δεν δείχνουν ότι τα WJ-MSCs είναι ολοδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, αποδεικνύουν όμως ότι είναι πολυδύναμα. Οι μελέτες έκφρασης των γονιδίων με μικροσυστοιχίες επιβεβαιώνουν επίσης ότι τα WJ-hMSCs εκφράζουν δείκτες και των τριών αρχέγονων βλαστικών στιβάδων.⁸

4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα βλαστικά κύτταρα, στο σύνολό τους, προσφέρουν τη δυνατότητα για επιστημονικές μελέτες που εκτείνονται πέραν της Αναγεννητικής Ιατρικής. Προσφέρουν μια διέξοδο μέσα από την οποία είτε θα αναθεωρηθούν είτε θα επισφραγιστούν πολλά από τα θεμελιώδη βιολογικά ερωτήματα. Παρατηρώντας τον τρόπο με τον οποίο τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα παράγουν εξειδικευμένα κύτταρα, είναι ωσάν να παρακολουθούμε την πρώιμη ανάπτυξη των ιστών και των οργάνων στο ανθρώπινο σώμα. Με την έρευνα όσον αφορά στα βλαστικά κύτταρα μπορεί να γίνει καταγραφή των επιπτώσεων των γενετικών και των επιγενετικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να υπάρξουν μελέτες οι οποίες να στοχεύουν στον κυρίαρχο ρόλο των γονιδίων στην ανάπτυξη του ανθρώπου και στον ρόλο των μεταλλάξεων στην απορρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών. Επί πλέον, θα μπορεί να μελετηθεί σε βάθος ο τρόπος με τον οποίο οι διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες εισβάλλουν και καταστρέφουν τα κύτταρα του ανθρώπου. Ταυτόχρονα, από τις συγκεκριμένες μελέτες μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα για τη συμμετοχή των γενετικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην πρόκληση και την επαγωγή των διαφόρων τύπων καρκίνου και άλλων νοσημάτων, καθώς και για την κυτταρική γήρανση και τη φυσιολογικά προκαλούμενη αλλοίωση του γενετικού προφίλ των κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν επίσης να αποτελέσουν τομή στην παραδοσιακή χημική Ιατρική. Η ικανότητά τους να διαιρούνται για μεγάλες χρονικές περιόδους και να διαφοροποιούνται σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων καθιστά δυνατή και αξιόπιστη τη

χρήση τους ως εργαλεία ελέγχου φαρμακευτικών ουσιών και αξιολόγησης των ανεπιθύμητων ενεργειών των τοξινών, χωρίς να τίθεται κάποιο ζήτημα κινδύνου για την υγεία των προσφερόμενων εθελοντών. Στο μέλλον, θα μπορεί να ελεγχθεί ταχέως η κυτταροτοξικότητα χιλιάδων ουσιών σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων που έχουν παραχθεί από βλαστοκύτταρα, καθιστώντας έτσι την ανακάλυψη και τη χρήση των νέων φαρμάκων αποτελεσματικότερη και με πολύ χαμηλότερο κόστος.

Η διαδικασία που αποκαλείται πυρηνική μεταφορά αποτελεί μια άλλη πιθανή μέθοδο παραγωγής εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Στα ζώα, η πυρηνική μεταφορά διενεργείται με την εισαγωγή του πυρήνα ενός ήδη διαφοροποιημένου ενήλικου κυττάρου –για παράδειγμα ενός κυττάρου του δέρματος– σε ένα ωάριο από το οποίο έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας. Το ωάριο αυτό, που πλέον περιέχει το γενετικό υλικό του κυττάρου του δέρματος, διεγείρεται ώστε να σχηματίσει μια βλαστοκύστη, από την οποία μπορούν να παραχθούν εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Συνεπώς, τα βλαστοκύτταρα που δημιουργούνται με τη συγκεκριμένη μέθοδο θα αποτελούν «κλώνους» του αρχικού ενήλικου κυττάρου, καθώς το πυρηνικό DNA τους είναι όμοιο με το δικό του. Η χρήση της πυρηνικής μεταφοράς μπορεί να αποτελέσει βασικό εργαλείο για τον έλεγχο φαρμάκων που στοχεύουν σε γενετικές ασθένειες. Για παράδειγμα, είναι δύσκολο να μελετηθεί η εξελικτική πορεία της νόσου Alzheimer ή της νόσου Parkinson εντός του εγκεφάλου ζώντων ασθενών (*in vivo*). Απομονώνοντας, όμως, κύτταρα εγκεφάλου ασθενούς που πάσχει από τη νόσο Alzheimer και δημιουργώντας σειρά βλαστοκυττάρων με τη μέθοδο της πυρηνικής μεταφοράς θα είναι δυνατή (α) η ανίχνευση της πορείας της νόσου εργαστηριακά και (β) η *in vitro* δοκιμή φαρμάκων για την αναγέννηση των κυττάρων που έχουν καταστραφεί, χωρίς να εκτίθεται σε κίνδυνο η υγεία του ασθενούς.⁹

5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΖΩΩΝ

5.1. Το εναλλακτικό κίνημα των 3Rs

Το 1959, οι Βρετανοί ερευνητές Russell και Burch εισήγαγαν για πρώτη φορά την έννοια των τριών R (reduction, refinement and replacement ή μείωση, βελτίωση και αντικατάσταση) στο κλασικό τους έργο «Οι αρχές των μη βάνουσιων πειραματικών τεχνικών», θέτοντας τις βάσεις του εναλλακτικού κινήματος των 3Rs. Η εξέλιξη αυτή έχει αποτελέσει τομή στην ανάπτυξη δοκιμασιών, οι οποίες (α) μειώνουν τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για ένα πείραμα, (β) βελτιώνουν τις υπάρχουσες δοκιμασίες με την ελαχιστοποίηση του πόνου και του stress των ζώων και (γ)

στοχεύουν στην πλήρη αντικατάσταση των υπαρχόντων ζωικών μοντέλων με εναλλακτικές μεθόδους.¹⁰

5.2. *In vitro* τοξικότητα

Η σε βάθος μελέτη μη γενετοξικών (μη σχετιζόμενων, δηλαδή, με κυτταρογενετικές μεταλλαγές) *in vitro* δοκιμασιών τοξικότητας επανήλθε στο προσκήνιο στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Σε γενικές γραμμές, η *in vitro* τοξικότητα αφορά σε δοκιμές που δεν χρησιμοποιούν σπονδυλωτά ως συστήματα μοντελοποίησης. Η *in vitro* τοξικότητα αποτελεί τη μελέτη των τοξικών επιδράσεων, όπως παρατηρούνται σε ένα σύστημα έξω από το σώμα κάποιου ζώντος οργανισμού.¹¹ Η *in vitro* κυτταροτοξικολογία ή κυτταροτοξικότητα αναφέρεται στη χρήση τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας στις έρευνες τοξικολογίας. Τα μοντέλα κυττάρων μπορεί να είναι καλλιέργειες είτε πρωτογενών κυττάρων είτε αθανατοποιημένων και μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών ή βλαστικών κυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ορθή παρατήρηση των αποτελεσμάτων της εν λόγω δοκιμασίας είναι να υπάρχουν βασικές γνώσεις για την τοξικολογία των χημικών ουσιών που μελετώνται, όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκρισή τους.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των *in vitro* μελετών είναι (α) η δυνατότητα χρήσης κυττάρων του ανθρώπου, (β) η συγκριτική ευκολία στον χειρισμό των κυττάρων σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα και η ευκολότερη λήψη αποτελεσμάτων, (γ) η ευκολότερη εφαρμογή σύγχρονων βιοχημικών, κυτταρικών και μοριακών τεχνικών σε μηχανιστικές μελέτες και (δ) η δυνατότητα ανάλυσης μειγμάτων χημικών ουσιών.

Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και δυσκολίες στις εφαρμογές των *in vitro* μεθόδων τοξικολογίας που αφορούν (α) στο γεγονός ότι οι κυτταρικές καλλιέργειες είναι πολύ πιο απλοποιημένα συστήματα συγκριτικά με τον οργανισμό, (β) στην αδυναμία μελέτης και εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικών με την ακριβή λειτουργία κρίσιμων συστημάτων του οργανισμού (π.χ. ορμονικό, ανοσοποιητικό, νευρικό σύστημα) και (γ) στον περιορισμό των περισσότερων *in vitro* δοκιμασιών σε δοκιμές οξείας τοξικότητας. Απόρροια των παραπάνω είναι η έλλειψη σαφήνειας των *in vitro* αποτελεσμάτων τοξικότητας συγκριτικά με τις αναμενόμενες επιδράσεις των εξεταζόμενων φαρμάκων στον οργανισμό του ανθρώπου.

5.3. Τελικά σημεία της *in vitro* τοξικότητας

Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά τελικά σημεία (endpoints) για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας, τα οποία περιλαμβάνουν μετρήσεις διαφόρων

βιολογικών παραμέτρων, όπως είναι οι παρακάτω: (α) *Κυτταρικός θάνατος*: μη ειδικό τελικό σημείο, με το οποίο δεν παρέχεται η δυνατότητα διερεύνησης των μηχανισμών που τον προκάλεσαν. Οι διάφορες χημικές ουσίες θανατώνουν τα κύτταρα είτε με άμεση βλάβη των δομικών συστατικών του κυττάρου είτε με έμμεση παρεμβολή στην κανονική φυσιολογία και τον μεταβολισμό του κυττάρου. (β) *Κυτταρική βιωσιμότητα*: τελικό σημείο είναι η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων. (γ) *Διαρροή της μεμβράνης*: τελικό σημείο μέτρησης της κυτταρικής βλάβης είναι η εκτίμηση της εξωκυττάρωσης κυτταρικών συστατικών ή προϊόντων. (δ) *Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων*: τελικό σημείο είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μείωσης της σύνθεσης του DNA. (ε) *Μορφολογία των κυττάρων*: άρρηκτα συνδεδεμένες με την κυτταροτοξικότητα είναι οι μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου. Τελικό σημείο είναι η εκτίμηση των αλλαγών στο μέγεθος, στο σχήμα ή στην ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. (στ) *Κυτταρική λειτουργία*: τελικό σημείο μέτρησης είναι η αποτίμηση της θερμοδυναμικής και της μεταβολικής λειτουργίας. Το ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταροτοξικότητας, αφού αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου.¹² Ως δείκτες κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν, επίσης, η αναστολή των μεταβολικών διεργασιών, η εξάντληση συν-παραγόντων και η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (π.χ. ΜΤΤ, ΜΤS και ΧΤΤ: δοκιμασίες άλατος τετραζολίου). (ζ) *Κυτταρική προσκόλληση*: ως δείκτης κυτταροτοξικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η προσκόλληση στην επιφάνεια της καλλιέργειας, η αποκόλληση από την επιφάνεια καλλιέργειας, και η προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου.

5.4. Κυτταρικοί μηχανισμοί τοξικότητας

Τρεις είναι οι βασικοί μηχανισμοί τοξικότητας: Η βασική κυτταροτοξικότητα, η οργανοειδική κυτταροτοξικότητα και η τοξικότητα των οργανιδίων.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, ο Ekwall¹³ εισήγαγε για πρώτη φορά τον όρο «βασική κυτταροτοξικότητα», η οποία βασίζεται στις τοξικογενείς βλάβες των βασικών λειτουργιών των κυττάρων, που είναι αποτέλεσμα της δράσης των χημικών ουσιών σε αυτά. Εξ αιτίας της συγκεκριμένης επίδρασης, αναπόφευκτα θα επηρεαστούν και πιο εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες. Ως «βασική κυτταρική τοξικότητα» ορίζονται οι δυσμενείς επιπτώσεις στα λειτουργικά και στα δομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Μελέτες αναφορικά με τη βασική κυτταρική τοξικότητα μπορούν να διεξαχθούν μόνο σε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Σε επίπεδο κυττάρου, η

επίδραση της «βασικής κυτταροτοξικότητας» παρατηρείται στους παρακάτω δομικούς και λειτουργικούς παράγοντες: (α) Στην ακεραιότητα των μεμβρανών και του κυτταροσκελετού, (β) στον κυτταρικό μεταβολισμό (π.χ. ως συνάρτηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας), (γ) στη σύνθεση του DNA και των πρωτεϊνών, (δ) στη σύνθεση/αποικοδόμηση/απελευθέρωση συστατικών ή προϊόντων του κυττάρου, (ε) στην ιοντική ρύθμιση (π.χ. αντλίες Na/K και αντλία Ca/K), (στ) στην κυτταρική διαίρεση και (ζ) στις κυτταρικές διεργασίες, όπως μετάφραση/πρωτεϊνοσύνθεση (ριβοσώματα) ή κατάτμηση/φαγοκυττάρωση (λυσosώματα).

Βάσει όσων περιγράφηκαν παραπάνω, οι *in vitro* δοκιμές τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι για τη συγκριτική μελέτη της τοξικότητας πολλών ουσιών και ενδεχομένως να αποτελέσουν μεθόδους που θα αντικαταστήσουν τις *in vivo* δοκιμές τοξικότητας και, πιο συγκεκριμένα, τις δοκιμές οξείας θανατηφόρου τοξικότητας (acute lethal toxicity).

Εν τούτοις, η *in vitro* τοξικότητα δεν αποτελεί αποτελεσματική δοκιμή για χημικές ουσίες οι οποίες απαιτούν βιομετατροπή (δηλαδή ενδοκυττάριο μεταβολισμό). Για τέτοιου είδους ουσίες χρησιμοποιούνται καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων που προέρχονται από όργανα τα οποία διατηρούν υψηλό επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπρόσθετα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο PBPK (physiologically based pharmacokinetic model) σε συνδυασμό με πληροφορίες σχετικές με τη βιοκινητική των χημικών ουσιών. Το μοντέλο PBPK χρησιμοποιείται ως προσομοιωτής των δυναμικών της χημικής απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης των χημικών ουσιών και φαρμάκων στην κυτταρική σειρά που μελετάται.¹⁴

Η «οργανοειδική τοξικότητα» ουσιαστικά αποτελεί τμήμα της βασικής κυτταροτοξικότητας, η οποία εμφανίζεται στα όργανα-στόχους. Η μελέτη της οργανοειδικής κυτταροτοξικότητας απαιτεί καλλιέργειες πρωτογενών, πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων προερχόμενων από διαφορετικά όργανα.

Τέλος, η τοξικότητα των οργανιδίων θα μπορούσε να μελετηθεί έμμεσα σε κυτταρικές καλλιέργειες με εξέταση των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων.

6. ΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι δοκιμασίες τοξικότητας με τη χρήση των βλαστικών κυττάρων μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, βάσει της τοξικότητας που προκαλούν στα κύτταρα: (α) *Δοκιμασίες κυτταρικής τοξικότητας*: υπολογίζεται η οξεία το-

ξικότητα των κυττάρων προκαλούμενη από φαρμακευτικές ουσίες με τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης και τον υπολογισμό του ποσοστού επιβίωσης. (β) *Δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας*: υπολογίζεται η αναστολή της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σε διάφορους τύπους κυτταρικών σειρών. (γ) *Λειτουργικές δοκιμασίες τοξικότητας*: προσδιορίζεται η αναστολή ή η διέγερση της κυτταρικής λειτουργίας των διαφοροποιημένων κυττάρων.^{15,16}

6.1. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης της τοξικότητας

Όλες οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας στοχεύουν, σε γενικές γραμμές, στον προσδιορισμό των επιδράσεων των υπό δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πολυτρυβλία 96 βοθρίων και επεξεργάζονται στις εκάστοτε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις για τις χημικές ουσίες δοκιμής. Τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης που προκύπτουν αποτελούν και τον βαθμό τοξικότητας. Μέχρι σήμερα, έχει δοκιμαστεί μια πληθώρα τεχνικών τοξικότητας σε ιστοειδικές κυτταρικές σειρές με χαρακτηριστική εγγενή κυτταρική λειτουργία, μέσω των οποίων έχουν σχεδιαστεί απλουστευμένες *in vitro* δοκιμασίες τοξικότητας, που μπορούν να αντικαθιστούν τις *in vivo* δοκιμασίες τοξικότητας.¹⁶ Ένα παράδειγμα ιστοειδικής κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμασίες *in vitro* τοξικότητας αποτελεί η κυτταρική σειρά Caco-2, προερχόμενη από αδενοκαρκίνωμα του επιθηλίου του παχέος εντέρου.¹⁷

Παρά τα όσα περιγράφηκαν παραπάνω, ο ίδιος ο ανθρώπινος οργανισμός χαρακτηρίζεται από εντυπωσιακά πολύπλοκες βιολογικές διαδικασίες συγκριτικά με τις απομονωμένες κυτταρικές σειρές. Αυτό οφείλεται στην άμεση ενεργοποίηση διαφορετικών μεταβολικών οδών (πολυπαραγοντικότητα) μετά από χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών, όπως τα σύμπλοκα μετάλλων ή τα ξενοβιοτικά μικρού μοριακού βάρους (MB) και τη μετανάστευσή τους στα κύτταρα-στόχους. Παραδείγματα τέτοιων βιολογικών λειτουργιών αποτελούν: (α) Η μετατροπή των ξενοβιοτικών, μετά την από του στόματος ή την υποδόρια λήψη τους, σε ουρία μέσω της διαδικασίας της πέψης ή της απορρόφησης μέσα στο αίμα και της κατανομής τους στους ιστούς, (β) ο αυστηρός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τα ξενοβιοτικά όταν πρόκειται να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ώστε να προσληφθούν από τα νευρικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ).

Έχει αναφερθεί ότι τα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα έχουν πολύ διαφορετική απόκριση σε φάρμακα συγκριτικά με τις διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές.

Πιο συγκεκριμένα, τα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες στην καλλιέργεια και να εκφράζουν μόρια-φορείς τα οποία μεταφέρουν τα ξενοβιοτικά έξω από το κύτταρο.¹⁶ Πριν από περίπου μία δεκαετία δημοσιεύτηκε από το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) ένα πρωτόκολλο, το οποίο περιγράφει τη δοκιμασία EST (embryonic stem cell test). Με την εν λόγω δοκιμασία ερευνήθηκε η εμβρυϊκή τοξικότητα με τη χρήση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού, η οποία και επικυρώθηκε από επόμενες μελέτες.¹⁸ Ταυτόχρονα, οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικής διαφοροποίησης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των κινδύνων τοξικότητας από τις χορηγούμενες χημικές ενώσεις, με τη χρήση υπολογιστικών φύλλων. Στην προαναφερθείσα μέθοδο έχουν βασιστεί πολλές δοκιμασίες τοξικότητας ES με τη χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για μετρήσεις τοξικότητας ES χρησιμοποιούνται σωματικά βλαστικά κύτταρα, ενώ για μετρήσεις τοξικότητας μετάλλων βιοϊατρικής χρήσης χρησιμοποιούνται νευρικά και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.¹⁹ Σε πολλές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν εξ ίσου πολυδύναμα και σωματικά βλαστικά κύτταρα σε δοκιμασίες τοξικότητας και διαφοροποίησης. Το αποτέλεσμα αυτών των συνδυαστικών μεθόδων ήταν η καταγραφή και ο υπολογισμός της αναπτυξιακής τοξικότητας των βλαστοκυττάρων.¹⁹⁻²¹

Με τις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας υπολογίζεται η κυτταρική καταστροφή (απόπτωση, κυτταρικός θάνατος, αδυναμία διαφοροποίησης). Μια παρατήρηση, όμως, που πρέπει να αναφερθεί είναι η εξής: Η τιμή IC50 ποικίλλει ανάλογα με τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου που χρησιμοποιείται στην κυτταρική καλλιέργεια. Τα βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά σε διαφορετικό καλλιεργητικό μέσο σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές και άρα τα δεδομένα που λαμβάνονται με τη χρήση βλαστοκυττάρων χρειάζονται περαιτέρω ανάλυση, ώστε να υπάρχει ορθή σύγκριση με τις καθιερωμένες τιμές συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών (control).

6.2. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης αναπτυξιακής τοξικότητας

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, πιθανές μη φυσιολογικές διαφοροποιήσεις των βλαστικών κυττάρων οδηγούν σε αναπτυξιακές ανωμαλίες και καρκινογένεση. Οι δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των κινδύνων που προκαλούν οι παραπάνω μη φυσιολογικές διαφοροποιήσεις, μετρώντας τον βαθμό διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Μερικές από τις τεχνικές

που εφαρμόζονται για τους εν λόγω υπολογισμούς είναι η κυτταρομετρία ροής, η μέτρηση αποικιών ελευθέρων κυττάρων, η γονιδιακή έκφραση και η μικροσκοπία φθορισμού.²⁰ Βάσει των κανονισμών που τέθηκαν από τον ECVAM, στις δοκιμασίες εμβρυϊκής τοξικότητας ES πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι μελέτης της τοξικότητας συνδυαστικά με μεθόδους αναπτυξιακής τοξικότητας σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και σε 3T3 ινοβλάστες.¹⁸⁻²¹ Με αυτόν τον τρόπο υπολογίζονται οι τιμές IC50 για τους 3T3 ινοβλάστες παράλληλα και συγκριτικά με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Επιπρόσθετα, οι τιμές ID50 των βλαστικών κυττάρων (μείωση κατά 50% του βαθμού διαφοροποίησής τους) προκύπτουν από τον υπολογισμό του βαθμού διαφοροποίησής τους σε κύτταρα του μυοκαρδίου. Και οι δύο παραπάνω παράμετροι (IC50, ID50) λαμβάνονται υπ' όψη σε μετρήσεις αναπτυξιακής τοξικότητας. Όσον αφορά, όμως, στο πρωτόκολλο αναπτυξιακής τοξικότητας ES, υπολογίζεται μόνο η τιμή ID50, εξ αιτίας του γεγονότος ότι η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων περιορίζεται μόνο σε καρδιομυοκύτταρα.

Αντίθετα με τις δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας, όσον αφορά στη νευρο-αναπτυξιακή τοξικότητα υπάρχουν ακόμη πολλές μελέτες οι οποίες πρέπει να προχωρήσουν, ώστε να προκύψουν ευαίσθητες τεχνικές για συγκριτικές μελέτες φαρμάκων διαφόρων νόσων που προσβάλλουν το ΚΝΣ. Έως τώρα, έχουν αναφερθεί νέες μέθοδοι με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και των τεχνικών μεταγραφομικής ανάλυσης (qPCR, μικροσυστοιχίες).²² Για τις μετρήσεις της νευρο-αναπτυξιακής τοξικότητας χρησιμοποιούνται εξ ίσου πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και νευρικά βλαστοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει πρόοδος στις δοκιμασίες νευροτοξικότητας στο επίπεδο της ανάλυσης της κυτταρικής διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και της ανάπτυξης των κυττάρων με τη μελέτη των τρισδιάστατων δομών των νευροσφαιρών (neurospheres).²¹

6.3. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες καταγραφής της κυτταρικής λειτουργίας μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες

Η άδεια χρήσης των πολυδύναμων και των σωματικών βλαστικών κυττάρων παρέκαμψε το ηθικό εμπόδιο που προϋπήρχε για τη συλλογή κυττάρων από ιστούς ενηλίκων ανθρώπων. Πρόσφατα, προχώρησαν διάφορες μελέτες για την κατανόηση των μηχανισμών της ηλεκτροφυσιολογίας και της μεταβολικής λειτουργίας διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων από εμβρυϊκά (ES cells) και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSC cells),^{22,23} που προήλθαν από διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο τύποι κυττάρων, οι οποίοι αποτελούν «πρότυπες

ομάδες ελέγχου» για δοκιμασίες καταγραφής της κυτταρικής λειτουργίας, με τη χρήση ηλεκτροφυσιολογικών μετρήσεων. Αυτούς τους τύπους αποτελούν τα κύτταρα του μυοκαρδίου και τα νευρικά κύτταρα. Τέτοιου είδους διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν στην επιφάνεια ενός συστήματος πολυ-ηλεκτροδίων, μέσω του οποίου παρατηρούνται και υπολογίζονται το δυναμικό ενέργειάς τους, καθώς και ο πολλαπλασιασμός τους.²⁴ Επιπρόσθετα, έχουν εκπονηθεί μελέτες όπου μετά τη διαφοροποίηση των ES/iPSCs σε νευρώνες έχει μελετηθεί το κατώφλι της αυθόρμητης δημιουργίας δικτύου νευρώνων, η οποία κυμαίνεται ανάλογα με τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου.²⁵

Τα ηπατοκύτταρα, λόγω της μεταβολικής τους δραστηριότητας, αποτελούν και αυτά σημαντικά εργαλεία στις τοξικολογικές μεθόδους, όπως και στις μεθόδους συγκριτικής ανάλυσης των φαρμάκων. Πρόσφατες έρευνες αναφέρονται στην παραγωγή μεταβολικά ενεργών ηπατοκυττάρων από ανθρώπινα ES και πολυδύναμα iPSCs.²² Τα αποτελέσματα των εν λόγω ερευνών έδειξαν έκκριση λευκωματίνης, αποθήκευση γλυκογόνου, ενεργότητα του κυτοχρώματος p450 (CYP), καθώς και ικανότητα μεταβολισμού των φαρμάκων στα οποία εκτέθηκαν τα διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα. Σε κυτταρικές σειρές με έκδηλες τις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες εφαρμόζονται βασικές λειτουργικές μέθοδοι, όπως οι ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις και οι μεταβολικές λειτουργικές μέθοδοι. Υπάρχουν βέβαια και άλλα κριτήρια εκτός από τη λειτουργία του κυττάρου, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της κυτταρικής φυσιολογίας, όπως για παράδειγμα το κυτταρικό σχήμα.

6.4. Συντήρηση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες τοξικότητας

Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των βλαστικών κυττάρων είναι η συντήρησή τους σε ιδανικές συνθήκες. Αναγκαία συνθήκη για τη χρήση ES και iPS βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες τοξικότητας αποτελεί η συντήρησή τους σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Αυτό επιτυγχάνεται με προσθήκη κυτταρικών στρωμάτων τροφοδοσίας (feeder layers) των βλαστοκυττάρων και, πιο συγκεκριμένα, από τροφοδοτικά στρώματα ινοβλαστών ποντικού. Ένα βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας αποτελεί η διάκριση μεταξύ της άμεσης και της έμμεσης μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία προκύπτει από την προσθήκη κάποιας ουσίας στην καλλιέργεια. Ειδικότερα, δεν μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό αν η τοξική ουσία που προστίθεται στην καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων επιδρά άμεσα στα βλαστοκύτταρα ή στο κυτταρικό στρώμα τροφοδοσίας από ινοβλάστες ποντικού. Πρόσφατα, έχουν δημιουργηθεί και χρησιμοποιούνται συ-

στήματα καλλιέργειας βλαστοκυττάρων ελεύθερα στρωμάτων τροφοδοσίας, που χρησιμοποιούν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και άλλες ενώσεις, με τις οποίες το συγκεκριμένο πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί.²⁶ Αυτό που μένει να ερευνηθεί είναι το αν τα αποτελέσματα των τοξικολογικών μελετών μεταξύ των δύο συστημάτων βλαστικών κυττάρων (του κλασικού και του ελεύθερου κυτταρικού στρώματος τροφοδοσίας) διαφέρουν ή είναι ίδια, ενδεχομένως μετά και από κανονικοποίηση ορισμένων τιμών.

7. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

7.1. Στοχεύοντας προς τη δημιουργία πρότυπων συστημάτων βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου με σκοπό τη διάγνωση και τη θεραπεία

Η ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους των διαφόρων ιστών κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής παρέχει τη δυνατότητα στον οργανισμό να αναδημιουργεί, έως ένα βαθμό, τους εκάστοτε ιστούς εξ αιτίας πιθανών τραυματισμών, ή ακόμη και μετά από χημειοθεραπείες που προκαλούν ευρεία κυτταροτοξικότητα. Αντίθετα από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, τα σωματικά βλαστικά κύτταρα που παράγονται σε θέσεις όπως ο μυελός των οστών και το ήπαρ έχουν περιορισμένη δυνατότητα αναπτυξιακής διαφοροποίησης και γι' αυτό συχνά χαρακτηρίζονται και ως πολυδύναμα.

Μια άλλη κατηγορία βλαστικών κυττάρων, τα iPSCs, μπορούν να απομονωθούν από υγιείς δότες και ασθενείς, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη διεξαγωγή νέων ερευνητικών δοκιμών. Η περαιτέρω κατανόηση και η περιγραφή των παθολογικών μηχανισμών των υπό μελέτη νόσων μπορεί να δώσει τη δυνατότητα δημιουργίας αναλυτικών πλατφορμών, που θα περιγράφουν με ακρίβεια τις κυτταρικές λειτουργίες των πλειοδύναμων αυτών βλαστικών κυττάρων και την εμπλοκή τους στους παραπάνω παθολογικούς μηχανισμούς. Ταυτόχρονα, λειτουργικές τεχνικές Γενομικής μπορούν να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα παθολογικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των iPSCs έχει δοθεί η δυνατότητα δημιουργίας γενετικά ταυτόσημων κυττάρων με αυτά που απομονώθηκαν από τον αρχικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα, τα iPSCs παρήχθησαν με επιγενετικό επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων, στα οποία προκλήθηκε εξωγενώς η έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, υπεύθυνων για την αποδιφοροποίηση των κυττάρων, έτσι ώστε αυτά πλέον να

βρίσκονται σε μια κατάσταση ομοιάζουσα με αυτή των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Οι Takahashi et al, βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι «παράγοντες υπεύθυνοι για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τη μείωση της πολυδυναμίας των σωματικών βλαστικών κυττάρων των ενηλίκων», κατόρθωσαν να ταυτοποιήσουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct3/4, Sox2, Klf4 και c-Myc, οι οποίοι επαναπρογραμματίζουν ινοβλάστες ποντικού σε iPSCs.²⁶ Αυτό αποδείχθηκε, καθώς μετά από κάποιες εβδομάδες προέκυψαν κύτταρα με μορφολογία και επιφανειακά αντιγόνα που ομοιάζαν με εκείνα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Το 2007 ανακοινώθηκε ο επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών του ανθρώπου σε iPSCs, με τη χρήση του ίδιου συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων αλλά και αντικαθιστώντας τους Klf4 και c-Myc με τους Nanog και Lin28.²⁷

Όλες οι σχετικές ερευνητικές εξελίξεις αναδεικνύουν τις τεράστιες δυνατότητες αναφορικά με την τεχνολογία των iPSCs. Σε κλινικό επίπεδο, παρ' όλα αυτά, η χρήση των iPSCs είναι περιορισμένη, καθώς εγείρει θέματα επικινδυνότητας λόγω (α) της πιθανής επαγόμενης μεταλλαξιγένεσης από την ενσωμάτωση των ιικών φορέων στο γενετικό υλικό, και (β) της ενδεχόμενης υπερέκφρασης των εισαχθέντων γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων, μερικά από τα οποία θεωρούνται ογκογονίδια, όπως για παράδειγμα το c-Myc. Στην προσπάθεια μείωσης των εν λόγω κινδύνων, οι επιστήμονες έχουν οδηγηθεί σε δοκιμές καθοδηγούμενης έκφρασης των προαναφερθέντων μεταγραφικών παραγόντων. Η καθοδηγούμενη έκφραση επιτυγχάνεται με τη χρήση πλασμιδίων, «επισωματικών» φορέων που δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό (non-integrating "episomal" vectors), και τη χρήση του συστήματος τραπεζοζονίων riggyPac. Πιο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί μια νέα, πολλά υποσχόμενη μέθοδος επαναπρογραμματισμού, που βασίζεται στη χρήση mRNA και microRNA. Οι παραπάνω μέθοδοι, σε συνδυασμό με την τεχνολογία των iPSCs, θα δώσουν νέες προοπτικές στην Αναγεννητική Ιατρική, ενώ παράλληλα θα συμβάλουν στην περιγραφή των μηχανισμών αιτιοπαθογένειας σπάνιων ασθενειών, με σκοπό την ανάπτυξη εξατομικευμένων διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων.^{28,29}

7.2. Η χρήση της τεχνολογίας των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου για την αξιολόγηση (screening) των φαρμάκων

Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν αναμφισβήτητη τη μέθοδο αναφοράς (golden standard) για την ταυτοποίηση

και την καταγραφή των ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμακευτικών ουσιών στην ανάπτυξη των θηλαστικών. Εν τούτοις, υπάρχουν περιορισμοί στην ικανότητά τους να προβλέψουν την τοξικότητα των φαρμάκων στους ανθρώπους. Διάφορα φάρμακα, τα οποία έχουν μελετηθεί προηγουμένως σε ζωικά μοντέλα, παρά την προβλεπόμενη ασφάλειά τους που προκύπτει από τα πειράματα, είναι υπεύθυνα για την πρόκληση σοβαρών τοξικών βλαβών και αποβολών κατά τη διάρκεια της κύησης στον άνθρωπο. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στη μεγαλύτερη ευαισθησία των ανθρώπινων εμβρύων έναντι των σχετικών φαρμάκων, σε αντίθεση με τα έμβρυα των πειραματοζώων. Κλασικό παράδειγμα τέτοιου φαρμάκου αποτέλεσε, στο παρελθόν, η θαλιδομίδη, η οποία προκάλεσε τερατογενέσεις όταν γινόταν λήψη της από μέλλουσες μητέρες προς αποφυγή της πρωινής ναυτίας της κύησης.³⁰ Άλλο παράδειγμα αποτελεί η χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος TGN1412 σε κλινικές δοκιμές 6 ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδή αρθρίτιδα και λευχαιμία,³¹ οι οποίοι στο σύνολό τους εμφάνισαν πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο. Με αφορμή την ανάγκη ανακάλυψης ενός νέου μοντέλου τοξικότητας, με μεγαλύτερη ικανότητα πρόβλεψης και αυτοματοποίησης της απόκρισης του ανθρώπου σε φαρμακευτικές ουσίες, οι έρευνες έχουν προσανατολιστεί πλέον στη χρήση των βλαστικών κυττάρων που απομονώνονται από τον άνθρωπο, ως συστήματα ανίχνευσης της φαρμακευτικής τοξικότητας. Με τα εν λόγω συστήματα, όχι μόνο θα αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των προκλινικών δοκιμών κυτταροτοξικότητας των δοκιμαζόμενων φαρμάκων, αλλά παράλληλα θα μετριαστούν και οι δημόσιες ανησυχίες που αφορούν στη χρήση ζώων στην έρευνα.

Η διερεύνηση της τοξικότητας μιας ουσίας αποτελεί βασικό ζητούμενο στην ανάπτυξη και στον σχεδιασμό φαρμάκων, ιδιαίτερα αν ληφθεί υπ' όψη το γεγονός ότι η εκτίμηση της οργανικής ανεπάρκειας λόγω τοξικών βλαβών μπορεί να υπάρξει μόνο στα τελικά στάδια της νόσου. Ταυτόχρονα, υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην εκτίμηση της τοξικότητας στα πρώιμα στάδια σε ερευνητικό επίπεδο, καθώς και σε *in vitro* πειράματα με μετασχηματισμένες ή προερχόμενες από ζωικά μοντέλα κυτταρικές σειρές. Η παραπάνω δυσκολία είναι πιθανόν να ξεπεραστεί αν υπάρξει πρώιμη εκτίμηση σε φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπου, τα οποία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά ως προς την έκφραση και τις μεταβολικές τους αποκρίσεις σε σχέση με τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα *in vitro* μελέτης. Αναπτυσσόμενες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές με εγγενείς λειτουργίες –προερχόμενες από βλαστικά κύτταρα– μπορούν να αποτελέσουν το βασικό εργαλείο για τη δημιουργία συστημάτων εκτίμησης των φαρμάκων.

Σημαντικά είναι τα δεδομένα ερευνών που αφορούν στη βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας των βλαστικών κυττάρων προς την αποτελεσματικότερη διαφοροποίησή τους στους ζητούμενους κυτταρικούς τύπους. Ενδεικτικά, έχει αποδειχθεί η σημασία της χρήσης ικριωμάτων για την παραγωγή λειτουργικών ηπατοκυττάρων, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να αποτελέσουν σύστημα αξιολόγησης των πρώιμων επιπτώσεων και των ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων (σε κλίμακα από πρώιμες ανεπιθύμητες ενέργειες σε όψιμες). Επίσης, η σύσταση του καλλιεργητικού μέσου είναι καθοριστική για τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων σε ώριμους νευρώνες, δομικά και φαινοτυπικά κατάλληλους για χρήση σε τεχνικές εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας με υψηλή ακρίβεια.³² Συνεπώς, από βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από τον άνθρωπο, κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, μπορούν να προκύψουν διαφοροποιημένα κύτταρα και ιστοί, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως μοντέλα εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας, με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος.

7.3. Μείωση του κόστους ανάλυσης και εκτίμηση των φαρμακευτικών και των τοξικών ουσιών με τη χρήση των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου

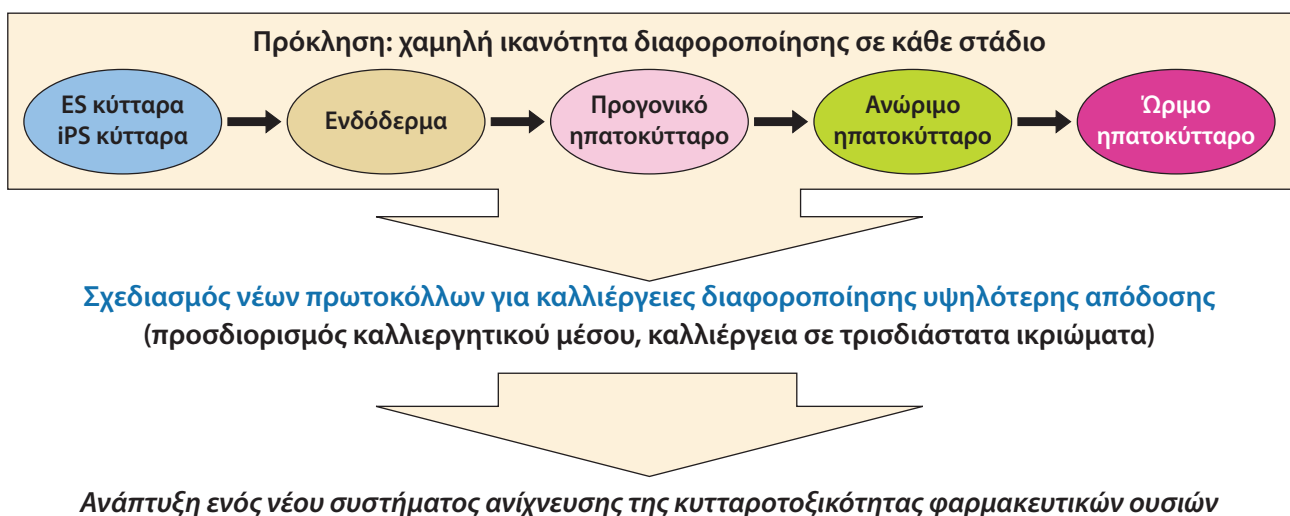
Η νέα τεχνολογία των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δεδομένων που προκύπτουν από *in vitro* συστήματα, έτσι ώστε να διενεργούνται παράλληλα και μελέτες της δοσοεξαρτώμενης απόκρισης στο μελετώμενο φάρμακο. Επί πλέον, καθίσταται δυνατή

και η ανάλυση δεδομένων που αφορούν στην έκφραση γονιδίων/πρωτεϊνών και στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το μεταβολικό προφίλ του κυττάρου. Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα πρόβλεψης των ποικίλων αποκρίσεων του ανθρώπου σε φάρμακα με πολύ χαμηλό κόστος.

Για την ανάπτυξη μεθόδων πρόβλεψης της κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις εξής παραμέτρους: (α) Τη δυνατότητα πρόσβασης σε απεριόριστες ποσότητες βλαστοκυττάρων που θα έχουν προβλέψιμη συμπεριφορά σε συνθήκες καλλιέργειας, (β) τη δημιουργία πρωτοκόλλων που θα αφορούν στη διαδικασία διαφοροποίησης και στον ακριβή προσδιορισμό των σταδίων της διαφοροποίησης. Όλα τα παραπάνω έχουν ως στόχο τελικά την εξακρίβωση της ασφάλειας του εκάστοτε φαρμάκου.

Πράγματι, τα ανθρώπινα ESCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χαρτογράφηση αναπτυξιακών μονοπατιών, συνεπώς και για τη δημιουργία των μοντέλων αναπτυξιακής τοξικότητας. Από την άλλη πλευρά, τα iPSCs προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης της ιστοειδικής ποικιλομορφίας των φυσιολογικών αποκρίσεων στα φάρμακα, καθώς καθίσταται εφικτή η διαφοροποίηση σε κύτταρα διαφορετικών ιστών που ενδέχεται να υποστούν βλάβες λόγω τοξικότητας (εικ. 4).

Τα κύρια όργανα που μπορούν να υποστούν βλάβες από την τοξικότητα των φαρμάκων είναι το ήπαρ, η καρδιά, καθώς και ο νευρικός ιστός. Πιο συγκεκριμένα, τα ογκοκατασταλτικά φάρμακα ευθύνονται για τα περισσότερα περιστατικά οξείας τοξικής ανεπάρκειας του ήπατος και της καρδιάς στους ασθενείς. Αυτό το δεδομένο καθιστά τα



Εικόνα 4. Σχεδιασμός πρωτοκόλλου διαφοροποίησης και ωρίμανσης ηπατοκυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα πλειοδύναμα κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs).

ηπατοκύτταρα και τα καρδιομυοκύτταρα ως τα κυριότερα παράγωγα βλαστοκυττάρων σε προκλινικές μελέτες τοξικότητας. Τα ηπατοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη μεταβολική τους ενεργότητα, έχουν το βασικότερο ρόλο στον μεταβολισμό των ουσιών. Συνεπώς, η ευαισθησία που επιδεικνύουν στους ελέγχους κυτταροτοξικότητας είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτική της ασφάλειας των εξεταζόμενων φαρμάκων.

Η Μεταβολομική και διάφορες άλλες μέθοδοι μελέτης του γενετικού προφίλ φαίνεται να υπόσχονται την ταυτοποίηση βιοδεικτών οι οποίοι ευθύνονται για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Η νέα αυτή τεχνολογία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση των περίπλοκων μονοπατιών της φυσιολογικής απόκρισης σε φάρμακα. Βιολογικά συστήματα προσέγγισης και *in silico* μέθοδοι που προκύπτουν μέσω της Γενομικής, της Πρωτεομικής, της Μεταγραφομικής και της Μεταβολομικής μπορούν να αποτελέσουν τομή στην ενσωμάτωση και στη σύνθεση αποτελεσμάτων από διαφορετικές ερευνητικές προσεγγίσεις, καθώς και να στοχοθετήσουν τις μελλοντικές έρευνες.⁶ Οι συγκεκριμένες έρευνες θα βασίζονται σε ανέξοδες μεθόδους πρόβλεψης της γενοτοξικότητας, της καρκινογένεσης και της ανοσοτοξικότητας.

7.4. Ανάπτυξη *in vitro* κυτταρικών συστημάτων πρόβλεψης της απόκρισης του ανθρώπου σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ουσιών

Ένας προοπτικός στόχος της τοξικολογίας είναι η ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων, τα οποία θα αντικατοπτρίζουν την ποικιλομορφία των αποκρίσεων των κυττάρων έναντι των χημικών ουσιών και των φαρμάκων σε διαφορετικούς ανθρώπινους πληθυσμούς. Μεταξύ των κυτταρικών σειρών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από διαφορετικούς ανθρώπους παρατηρείται τεράστια ποικιλομορφία ως προς τον βαθμό και τον ρυθμό διαφοροποίησής τους. Έτσι, ενώ κάποιες από αυτές τις διαφοροποιήσεις σχετίζονται με τυχαία γεγονότα ή και με τις διαφορετικές τεχνικές που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια, ο σημαντικότερος παράγοντας ποικιλομορφίας είναι το γενετικό προφίλ του ατόμου που αποτέλεσε την πηγή των εν λόγω κυτταρικών σειρών. Η κατανόηση των παραπάνω παραδοχών καθιστά εμφανή την ανάγκη απομόνωσης και μελέτης ολόενα και περισσότερων κυτταρικών σειρών από άτομα με διαφορετικές ευαισθησίες σε φάρμακα, νόσους και διαφορετικό ιστορικό έκθεσης σε εξωγενείς παράγοντες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η εξαγωγή συμπερασμάτων που να καλύπτει ένα ευρύτερο φάσμα της πληθυσμιακής ποικιλομορφίας.

Οι μεγάλες διαφορές που εντοπίζονται στους ανθρώπους σε γενετικό επίπεδο είναι αποτέλεσμα γενετικών πολυμορφισμών. Άρα, για την αντικειμενικότερη πρόβλεψη της χημικής απόκρισης των φαρμάκων στον άνθρωπο είναι αναγκαία η δημιουργία κυτταρικών σειρών από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα από ένα σύνολο ατόμων διαφορετικών ηλικιών, γενεών, φύλου και ιατρικού ιστορικού. Τα ήδη μελετημένα συστήματα των βλαστικών κυττάρων αποτελούν μοντέλα πρόβλεψης και περιγραφής της πολυπλοκότητας των γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούνται από διάφορα νοσήματα. Αποτελούν επίσης επικουρικά εργαλεία στη μεταφραστική έρευνα και στην ανάπτυξη των φαρμάκων. Πράγματι, τα βλαστικά κύτταρα τα προερχόμενα από τον άνθρωπο επιτρέπουν τη δημιουργία νέων *in vitro* μοντέλων, τα οποία θα προσομοιάζουν ανθρώπινους φαινότυπους που σχετίζονται με συγκεκριμένες νόσους. Τα μοντέλα αυτά θα μπορούσαν να θεμελιώσουν τη δημιουργία πληθυσμιακών πλατφορμών για μεταφραστικές έρευνες και να χρησιμοποιηθούν στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, σχετικών με την πρόγνωση, τη διάγνωση και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών.

Ένα φάρμακο μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες σε ορισμένους ασθενείς εξ αιτίας του γενετικού τους προφίλ ή λόγω έκθεσής τους σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Μέχρι τώρα δεν έχουν ανακαλυφθεί μέθοδοι που να προβλέπουν τυχόν μεμονωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες στο εκάστοτε φάρμακο. Πιθανόν, μελλοντικά θα χρησιμοποιούνται iPSC βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από ασθενείς με γνωστή ευαισθησία ή αντίσταση σε διάφορα φάρμακα, για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης κυτταροτοξικότητας.

Συμπερασματικά, με την τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων μπορούν να προσφερθούν πρωτοφανείς ευκαιρίες στο επίπεδο της εξατομίκευσης της φαρμακευτικής θεραπείας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα iPSCs έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, και όταν εισέρχονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης να δίνουν κύτταρα και από τις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες (δηλαδή εν δυνάμει όλες τις σωματικές κυτταρικές σειρές). Συνεπώς, με τη συγκεκριμένη τεχνολογία παρέχεται η δυνατότητα δημιουργίας *in vitro* μοντέλων από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από ξεχωριστά άτομα, καθιστώντας εφικτή την καταγραφή των διαφορετικών προδιαθεσικών παραγόντων κινδύνου για διάφορες ασθένειες. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την ανακάλυψη νέων, εξατομικευμένων φαρμάκων, καθώς και για την ανάπτυξη αποδοτικότερων και οικονομικότερων μοντέλων ελέγχου της τοξικότητας.³³

ABSTRACT

The use of stem cells in the establishment of drug toxicity models

K. KATSAOUNOU, E. TAKI, V. ZOUMPOURLIS

Biomedical Applications Unit, Institute of Biology, Medical Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2016, 33(1):8–21

Over the last 20 years there has been a rapid development in both human embryonic (hESCs) and adult stem cell culture techniques resulting in a significant increase in the availability of stem cells for research and potential use in cell therapies. Stem cells are classified into pluripotent and multipotent cells. The differentiation potency of stem cells (pluri-/multipotency) makes them potentially attractive for *in vitro* cytotoxicity and developmental toxicity assays. Recent research has been directed towards the improvement of many conventional models of toxicity screening or their replacement with more relevant human systems. This will result in enhanced drug toxicology prediction and enable the testing of potential developmental toxicants, which cannot be investigated in humans, because of bioethical issues. Human induced pluripotent stem cells (iPSCs), which are generated by reprogramming somatic cells into hESC-like cells, may be useful in elucidating the genetic and environmental factors that contribute to individual responses. This can be achieved by the establishment of *in vitro* toxicity models, created from individuals with a diverse range of drug susceptibilities, resistance or disease. The comprehensive profiles of hESC and iPSC cells and their complicated biochemical pathways of physiological response to drugs can be successfully clarified utilizing recent advances in the fields of genomics, proteomics, metabolomics and transcriptomics. In this way, the ever-increasing use of stem cell based *in vitro* toxicity models aims at: (a) Reduction of the number of animals used in toxicity testing, (b) improvement of risk assessment and drug biological response studies, and (c) development of more efficient, large-scale and low-cost models for the production and testing of new drugs.

Key words: Cytotoxicity, Developmental toxicity, Embryonic stem cells (ESCs), Induced pluripotent stem cells (iPSCs), Mesenchymal stem cells (MSCs), Stem cells

Βιβλιογραφία

1. WANG Z, ORON E, NELSON B, RAZIS S, IVANOVA N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012, 10:440–454
2. MAJO F, ROCHAT A, NICOLAS M, JAUDÉ GA, BARRANDON Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008, 456:250–254
3. KØRBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003, 349:570–582
4. BAUDIN B, BRUNEEL A, BOSSELUT N, VAUBOURDOLLE M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2007, 2:481–485
5. BONGSO A, FONG CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2013, 9:226–240
6. CAN A, KARAHUSEYINOGLU S. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 2007, 25:2886–2895
7. KITA K, GAUGLITZ GG, PHAN TT, HERNDON DN, JESCHKE MG. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010, 19:491–502
8. FONG CY, CHAK LL, BISWAS A, TAN JH, GAUTHAMAN K, CHAN WK ET AL. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2011, 7:1–16
9. US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Working with stem cells. Understanding stem cells. An overview of the science and issues from the National Academies. NAS, 2011, 1:8–12
10. VITALE A, MANCIOCCO A, ALLEVA E. The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2009, 33:33–47
11. CASTELL JV, GÓMEZ-LECHÓN MJ, PONSODA X, BORT R. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 1997, 13:331–338
12. BARILE FA, CARDONA M. Acute cytotoxicity testing with cultured human lung and dermal cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998, 34:631–635
13. EKWALL B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1983, 407:64–77
14. LU C, HOLBROOK CM, ANDRES LM. The implication of using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for pesticide risk assessment. *Environ Health Perspect* 2010, 118:125–130
15. MORI H, HARA M. Cultured stem cells as tools for toxicological

- assays. *J Biosci Bioeng* 2013, 116:647–652
16. COTOVIO J, GRANDIDIER MH, LELIÈVRE D, BREMOND C, AMSELLEM C, MALOUG S ET AL. *In vitro* assessment of eye irritancy using the Reconstructed Human Corneal Epithelial SkinEthic HCE model: Application to 435 substances from consumer products industry. *Toxicol In Vitro* 2010, 24:523–537
 17. FERNANDES MB, GONÇALVES JE, SCOTTI MT, DE OLIVEIRA AA, TAVARES LC, STORPIRTIS S. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Toxicol In Vitro* 2012, 26:535–540
 18. SEILER AE, SPIELMANN H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro*. *Nat Protoc* 2011, 6:961–978
 19. SCANU M, MANCUSO L, CAO G. Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicol In Vitro* 2011, 25:1989–1995
 20. STUMMANN TC, HARENG L, BREMER S. Hazard assessment of methylmercury toxicity to neuronal induction in embryogenesis using human embryonic stem cells. *Toxicology* 2009, 257:117–126
 21. GASSMANN K, BAUMANN J, GIERSIEFER S, SCHUWALD J, SCHREIBER T, MERK HF ET AL. Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D *in vitro* applications. *Toxicol In Vitro* 2012, 26:993–1000
 22. THEUNISSEN PT, ROBINSON JF, PENNINGS JL, VAN HERWIJNEN MH, KLEINJANS JC, PIERSMA AH. Compound-specific effects of diverse neurodevelopmental toxicants on global gene expression in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, 262:330–340
 23. BAEK DH, KIM TG, LIM HK, KANG JW, SEONG SK, CHOI SE ET AL. Embryotoxicity assessment of developmental neurotoxicants using a neuronal endpoint in the embryonic stem cell test. *J Appl Toxicol* 2012, 32:617–626
 24. DUAN Y, MA X, ZOU W, WANG C, BAHBAHAN IS, AHUJA TP ET AL. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010, 28:674–686
 25. HOGBERG HT, SOBANSKI T, NOVELLINO A, WHELAN M, WEISS DG, BALPRICE AK. Application of micro-electrode arrays (MEAs) as an emerging technology for developmental neurotoxicity: Evaluation of domoic acid-induced effects in primary cultures of rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 2011, 32:158–168
 26. TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K ET AL. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, 131:861–872
 27. YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S ET AL. Induced pluripotent stem cell lines derive from human somatic cells. *Science* 2007, 318:1917–1920
 28. ANOKYE-DANSO F, TRIVEDI CM, JUHR D, GUPTA M, CUI Z, TIAN Y ET AL. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011, 8:376–388
 29. MIYOSHI N, ISHII H, NAGANO H, HARAGUCHI N, DEWI DL, KANO Y ET AL. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011, 8:633–638
 30. KUMAR N, SHARMA U, SINGH C, SINGH B. Thalidomide: Chemistry, therapeutic potential and oxidative stress induced teratogenicity. *Curr Top Med Chem* 2012, 12:1436–1455
 31. PONCE RA. Safety assessment of immunomodulatory biologics: The promise and challenges of regulatory T-cell modulation. *J Immunotoxicol* 2011, 8:389–397
 32. GONG G, ROACH ML, JIANG L, YANG X, TIAN XC. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine ESC-like cells. *Cell Reprogram* 2010, 12:151–160
 33. LIU W, DENG Y, LIU Y, GONG W, DENG W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *J Biochem Mol Toxicol* 2013, 27:17–27
- Corresponding author:*
- V. Zoumpourlis, Institute of Biology, Medical Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., GR-116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@eie.gr
-