

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΕΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΧΕΠΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΧΑΤΖΗΤΟΛΙΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2016-2017 ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 3414

IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ
ΜΕΓΑΛΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΠΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΚΥΒΕΝΤΙΔΗ
ΙΑΤΡΟΥ, ΠΑΘΟΛΟΓΟΥ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΣ ΔΙΔΑΓΓΕΛΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΠΑΝΟΥΔΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΣ ΔΙΔΑΓΓΕΛΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΠΑΝΟΥΔΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

ΧΑΤΖΗΤΟΛΙΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ, Καθηγητής
ΚΟΥΙΔΟΥ ΑΝΔΡΕΟΥ ΣΟΦΙΑ, Καθηγήτρια
ΤΣΑΤΑΛΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής
ΚΑΛΛΑΡΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των
γνωμών του συγγραφέα.

(Νόμος 5343/32, αριθμός 202 § 2 και νόμος 1268/82, άρθρο 50 § 8)

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Η διδακτορική διατριβή αφιερώνεται

στις κόρες μου Δήμητρα και Κατερίνα,

στη σύζυγό μου Νίκη,

στους γονείς μου Θωμά και Δήμητρα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η νοοτροπία...

Είναι δύσκολο να υλοποιήσεις τις ιδέες που έχεις. Χρειάζονται υλικές υποδομές και ένα δίκτυο ανθρώπων να σε υποστηρίξουν. Πρέπει να τα οργανώσεις όλα από την αρχή. Ο χρόνος που χρειάζεται για να υλοποιηθεί μια πρωτοφανής ιδέα είναι περισσότερος από αυτόν που φαντάζεσαι. Ιδιαίτερα όταν ταυτόχρονα εργάζεσαι για να ζήσεις.

Για όλα τα παραπάνω απαιτούνται θυσίες. Απογεύματα ξεκούρασης μετατρέπονται σε απογεύματα σκληρής δουλειάς. Φτάνεις σπίτι σου αργά το βράδυ έχοντας ξεκινήσει από νωρίς το πρωί. Παίρνεις μερικές μέρες άδεια και πηγαίνεις να συνεχίσεις τα πειράματά σου. Τα Σαββατοκύριακα εξισώνονται με τις καθημερινές.

Για να γίνουν τα παραπάνω, πρέπει να αγαπάς αυτό που κάνεις. Να αγαπάς την έρευνα και να έχεις πίστη ότι θα πετύχουν τα πειράματα. Να έχεις πίστη ότι αυτό που κάνεις θα αποδώσει καρπούς και θα είναι ωφέλιμο για την κοινωνία και την ιατρική επιστήμη. Αν δεις τη διατριβή ως πρόκληση και την εξερεύνηση ενός καινούργιου τόπου, τότε είσαι έτοιμος να ξεκινήσεις.

Για να πετύχουν τα πειράματα χρειάζεται επιμονή, υπομονή, θέληση, μέθοδος και ως άνθρωπος να διέπτεσαι από αξιοπρέπεια.

Μπορεί η διατριβή με περιορισμένους οικονομικούς πόρους και υλικοτεχνική υποδομή να οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα; Ο Michael Faraday ανακάλυψε νέους νόμους της φυσικής με απλά πειράματα και με απλά μέσα. Ευελπιστώ ότι μπορεί να γίνει το ίδιο και στην επιστήμη της Ιατρικής.

Οι γνώσεις που υπάρχουν για τα κύτταρα του αίματος συνεχώς αυξάνονται. Συνεχώς ανακαλύπτονται νέες ιδιότητες που έχουν τα κύτταρα όταν μεταναστεύουν μέσα στους ιστούς. Η παρούσα διατριβή προσπαθεί να ανακαλύψει τους νέους ρόλους και δυνατότητες που έχουν τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα.

Η υλοποίηση...

Οι καλλιέργειες της διατριβής, η παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο και οι ιστολογικές χρώσεις έγιναν στο εργαστήριο της Β' Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Η μέτρηση των επιπέδων ινσουλίνης με ανοσοφθορισμό και η κυτταρομετρία ροής έγιναν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Η μελέτη των κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγινε στο Εργαστήριο Ιστολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Παθολογίας-Αιματολογίας κυρία Ελισσάβητ Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου ανέθεσε τη διατριβή. Είμαι ευγνώμων που αξιολόγησε θετικά την ιδέα μου και δέχθηκε να την υλοποιήσουμε στα πλαίσια της διατριβής. Η βοήθειά της και η ηρεμία της ήταν σημαντικές για την επιτυχία της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας-Διαβητολογίας κύριο Τριαντάφυλλο Διδάγγελο που αγκάλιασε από την αρχή αυτή την προσπάθεια. Η στήριξή του ήταν καταλυτική. Τον ευχαριστώ που ανέλαβε ως επιβλέπων και μπήκε μπροστά. Εκτιμώ, ιδιαίτερα, τη βοήθεια που μου παρείχε σε κάθε βήμα της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κύριο Γεώργιο Τζημαγιώργη, ο οποίος στήριξε τη διατριβή και ανέλαβε ως μέλος της τριμελούς επιτροπής. Ήταν πάντα πρόθυμος να με ακούσει και να δώσει λύση στα προβλήματα που προέκυπταν. Τον ευχαριστώ που αφιέρωσε χρόνο και συνέβαλε ώστε η διατριβή να έχει υψηλή ποιότητα.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Αιματολογίας κύριο Εμμανουήλ Σπανουδάκη που αποδέχθηκε την πρόσκληση για συμμετοχή στην τριμελή επιτροπή. Ευχαριστώ που πίστεψε στη διατριβή, τη στήριξε και τη βοήθησε να ολοκληρωθεί.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κυρία Σοφία Κουίδου-Ανδρέου που αποδέχθηκε την πρόσκληση για συμμετοχή στην επταμελή επιτροπή. Την εκτιμώ ιδιαίτερα και την ευχαριστώ, διότι εκπόνησα την εργασία του μεταπτυχιακού μου υπό την καθοδήγησή της. Η περάτωση του μεταπτυχιακού μου έδωσε τη δυνατότητα για εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Παθολογίας και Διευθυντή της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, όπου ολοκλήρωσα την ειδικότητά μου στην Παθολογία, κύριο Απόστολο Χατζητόλιο που αποδέχθηκε την πρόσκληση για συμμετοχή στην επταμελή επιτροπή. Τον ευχαριστώ που προσπάθησε από τη θέση του να απλοποιήσει τις διαδικασίες και να εξασφαλίσει την ομαλή ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Αιματολογίας κύριο Κωνσταντίνο Τσαταλά που αποδέχθηκε την πρόσκληση για συμμετοχή στην επταμελή επιτροπή. Τον ευχαριστώ για την προθυμία του να βοηθήσει και να στηρίξει τη διατριβή.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Φυσιολογίας κύριο Κωνσταντίνο Καλλαρά που αποδέχθηκε την πρόσκληση για συμμετοχή στην επταμελή επιτροπή. Τον ευχαριστώ για τη θετική του προαίρεση και τη συμβολή του στην ομαλή ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Μικροβιολόγο κυρία Βασιλική Τσαβδαρίδου-Φώλα

για την υποστήριξή της.

Ευχαριστώ τη Μικροβιολόγο κυρία Σοφία Σπύρογλου για τη βοήθειά της στον ανοσοφθορισμό.

Ευχαριστώ τον τεχνικό κύριο Αναστάσιο Κουρκουτέλη για τη βοήθειά του στην κυτταρομετρία ροής.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κυρία Αικατερίνη Καϊδόγλου για τη βοήθειά της στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ευχαριστώ την τεχνικό κυρία Αικατερίνη Μουλά για τη βοήθειά της στα παρασκευάσματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Ευχαριστώ τη Βιολόγο-Ιατρό κυρία Γεωργία Βασιλείου για την τεχνική βοήθεια στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας. Δυστυχώς, λόγω περιορισμένων κονδυλίων δεν προχωρήσαμε στις μοριακές τεχνικές και στην απομόνωση RNA από τα κύτταρα, ώστε να διαπιστώσουμε τη γονιδιακή τους έκφραση.

Ευχαριστώ τη Διαβητολογική Εταιρεία Βορείου Ελλάδος για την υποτροφία που χορήγησε (απόφαση Διοικητικού Συμβουλίου 17/12/2009). Ευχαριστώ την Επιτροπή Ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την υποτροφία που χορήγησε (αριθμός πρωτοκόλλου 16046/2011). Το κόστος των υλικών για τα πειράματα ανήλθε περίπου στα 10.000€ και καλύφθηκε από τις παραπάνω υποτροφίες. Όλοι εργάστηκαν αφιλοκερδώς για την παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ την πεθερά μου Κατερίνα Βουλγαρίδου και τη φιλόλογο Ελένη Χαρίση για τη φιλολογική επιμέλεια του κειμένου.

Ευχαριστώ τη σύζυγό μου Νίκη για τη συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια της διατριβής. Την ευχαριστώ που μου παραχώρησε τον αναγκαίο χρόνο για να μπορέσω να την ολοκληρώσω επιτυχώς.

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
I. ΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΣ	23
II. Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	23
A. Η μοναδικότητα και τα χαρακτηριστικά των β κυττάρων	24
B. Ευπάθεια των β κυττάρων	25
C. Η σύνθεση και αποθήκευση της ινσουλίνης	25
D. Γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης	26
III. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	26
E. Επιδημιολογία	27
F. Ο διαβήτης τύπου 1.....	27
G. Ο διαβήτης τύπου 2.....	27
IV. ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	28
H. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.....	29
I. Σωματικά βλαστικά κύτταρα.....	29
J. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.....	30
K. Δυνατότητες διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.....	31
1. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.....	31
2. Σωματικά βλαστικά κύτταρα.....	32
3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.....	32
L. Δημιουργία β κυττάρων	32
1. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.....	33
2. Σωματικά κύτταρα.....	33
3. Μεσεγχυματικά κύτταρα από τον μυελό των οστών	34
4. Κύτταρα του ομφάλιου λώρου	35

V.	ΜΕΓΑΛΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ Ή ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	36
	Μ. Υποδοχείς μεταφοράς γλυκόζης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων	37
	N. Διαφοροποίηση των μεγάλων μονοπυρήνων	37
	O. Πολυδύναμα κύτταρα από μονοκύτταρα (monocyte-derived multipotential cells, MOMCs)	38
	P. Προγραμματιζόμενα Κύτταρα Μονοκυτταρικής Προέλευσης [Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMO)].....	41
VI.	ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	43
	Q. Τ λεμφοκύτταρα	43
	R. Β λεμφοκύτταρα	43
	S. Λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς (NK λεμφοκύτταρα).....	43
	T. Προέλευση και ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων	43
	U. Μορφολογία των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα	44
VII.	ΙΝΚΡΕΤΙΝΕΣ	44
	V. Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτιδίιο-1	45
	W. Ινσουλινότροπα ερεθίσματα.....	46
	X. Το φαινόμενο της ινκρετίνης	47
	Υ. Μείωση του φαινομένου της ινκρετίνης στον σακχαρώδη διαβήτη	47
	(α) Μειωμένη εκκριτική ικανότητα των β κυττάρων	48
	(β) Μειωμένη έκκριση ινκρετινών	48
	(γ) Απώλεια της δράσης του GIP	48
	(δ) Η υπεργλυκαιμία	49
	(ε) Μειωμένη ευαισθησία στις ινκρετίνες λόγω κληρονομικότητας	49
	στ) Επιβαρυντικός τρόπος ζωής	49

Z.	Επιδράσεις του GLP-1 στη βιοσύνθεση και έκκριση ινσουλίνης	50
AA.	Μηχανισμός δράσης του GLP-1 στη ρύθμιση της μάζας των β κυττάρων	51
VIII.	ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ GLP-1	53
BB.	Εξενατίδη-4.....	53
CC.	Λιραγλουτίδη	54
DD.	Επίδραση του GLP-1 και των αναλόγων του στα μονοκύτταρα.....	56
IX.	Η ΕΥΝΟΪΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΝΚΡΕΤΙΝΩΝ ΣΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ	56
X.	Η ευνοϊκή επίδραση των ινκρετινών στην αναστολή της αθηρογένεσης	57
XI.	ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ GLUT ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ.....	62
XII.	ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 3 (IL-3) ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (M-CSF).....	64
XIII.	2 – ΜΕΡΚΑΠΤΟΑΙΘΑΝΟΛΗ.....	65
XIV.	Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ	66
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
XV.	ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ.....	71
EE.	Σκοπιμότητα της διδακτορικής διατριβής.....	71
FF.	Ερευνητικά ερωτήματα	72
GG.	Ποια είναι η σημασία της αποδοχής ή της απόρριψης των ερευνητικών ερωτημάτων;	73
XVI.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	73
HH.	Δείγμα.....	73
II.	Ερευνητικό πρωτόκολλο.....	73

JJ.	Απομόνωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα.....	75
KK.	Πρωτόκολλο απομόνωσης.....	76
LL.	Η επεξεργασία του ορού.....	77
MM.	Η ινσουλίνη που περιέχεται φυσιολογικά στον ορό αίματος των δοτών.....	77
NN.	Καλλιέργεια των μονοπυρήνων.....	78
	1. Καλλιέργεια μονοπυρήνων με την παρουσία αυξητικών παραγόντων.....	78
	2. Καλλιέργεια μονοπυρήνων χωρίς αυξητικούς παράγοντες	78
OO.	Ιστολογική χρώση κατά May Grunwald-Giemsa.....	79
PP.	Κυτταρομετρία ροής.....	79
	1. Διαδικασία προετοιμασίας κυττάρων για κυτταρομετρία ...	82
QQ.	Τεχνική της ELISA.....	82
	1. Πρωτόκολλο της ELISA.....	84
RR.	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο.....	85
	1. Πρωτόκολλο επεξεργασίας δείγματος για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	85
SS.	Στατιστική ανάλυση.....	87
ΤΤ.	Έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης.....	88
XVII.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
XVIII.	ΕΝΑΡΞΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	89
UU.	Απομόνωση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα.....	89
VV.	Μελέτη των κυττάρων αμέσως μετά την απομόνωση με το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.....	90

WW.	Ιστολογικές χρώσεις απλών μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων αμέσως μετά την απομόνωσή τους από το περιφερικό αίμα	91
XX.	Μελέτη των κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	91
YY.	Κυτταρομετρία αμέσως μετά την απομόνωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων.....	92
ΧΙΧ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	94
ZZ.	Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο σε συνάρτηση με την ημέρα καλλιέργειας.....	94
AAA.	Κύτταρα με διπλό πυρήνα.....	96
BBB.	Κυτταρομετρία την 7η ημέρα καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες.....	97
CCC.	Κυτταρομετρία τη 14η ημέρα καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες.....	101
DDD.	CD έκφραση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια των καλλιιεργειών	103
ΧΧ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	104
EEE.	Οπτικό μικροσκόπιο	104
FFF.	Ιστολογικές χρώσεις κυττάρων	106
GGG.	Κυτταρομετρία κατά την 7η ημέρα καλλιέργειας	107
HHH.	Κυτταρομετρία κατά τη 14η ημέρα καλλιέργειας.....	110
ΧΧΙ.	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥΣ	112
XXII.	Οπτικό μικροσκόπιο	112
III.	Ιστολογικές χρώσεις.....	114
JJJ.	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	117

ΚΚΚ.	Ανάλυση της μορφολογίας των κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο καλλιέργειας.....	118
1.	Μονοκύτταρα	118
2.	Λεμφοκύτταρα	119
XXIII.	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ELISA	119
LLL.	Κυτταρομετρία ροής	119
MMM.	Αποτελέσματα μετρήσεων ινσουλίνης με μέθοδο ELISA	120
XXIV.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ	125
NNN.	Έλεγχος κανονικής κατανομής	125
OOO.	Ερευνητικό ερώτημα 1. Μπορούν τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα όταν συγκαλλιεργηθούν να παράγουν ινσουλίνη;	125
PPP.	Ερευνητικό ερώτημα 2. Επηρεάζει ο χρόνος καλλιέργειας την παραγόμενη ποσότητα ινσουλίνης;.....	126
QQQ.	Ερευνητικό ερώτημα 3. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης αυξηθεί στα 250 mg/dl, εκκρίνουν την ίδια ποσότητα ινσουλίνης η καλλιέργεια των 7 και των 14 ημερών;	126
RRR.	Ερευνητικό ερώτημα 4. Η αύξηση του επιπέδου γλυκόζης επηρεάζει την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης στα ίδια κύτταρα;	127
SSS.	Ερευνητικό ερώτημα 5. Οι αυξητικοί παράγοντες συνετέλεσαν στην αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης ή όχι;.....	128
TTT.	Στατιστική σύγκριση της έκκρισης ινσουλίνης μεταξύ των ομάδων	129
XXV.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	131
XXVI.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ I.....	143
XXVII.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ II.....	144

XXVIII.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	147
XXIX.	SUMMARY	149
XXX.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151

Συντομογραφίες

CD marker	Cluster of Differentiation marker
CFU-GM	Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage
CFU-M	Colony Forming Unit-Macrophage
EGF	Epidermal Growth Factor
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IL-3	Interleukin 3
M-CSF	Macrophage - Colony Stimulating Factor
MOMCs	Monocyte-derived Multipotent Cells
PCMOs	Progenitor Cells of Monocytic Origin
SFCA	Surfactant Free Cellulose Acetate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute culture medium

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΣ

Το πάγκρεας αποτελείται από δύο μοίρες, την εξωκρινή και την ενδοκρινή μοίρα, οι οποίες έχουν πολύ ευδιάκριτες λειτουργίες. Η ενδοκρινής μοίρα αποτελείται από τα νησίδια Langerhans, τα οποία αποτελούνται από τις ομάδες τεσσάρων τύπων κυττάρων που συνθέτουν τις πεπτιδικές ορμόνες: ινσουλίνη (β-κύτταρα), γλουκαγόνο (α-κύτταρα), σωματοστατίνη (δ-κύτταρα) και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (γ-κύτταρα). Για τα παραπάνω κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι διαφοροποιούνται από τα βλαστικά κύτταρα στο επιθήλιο των εκφορητικών πόρων μέσω της διαδοχικής διαφοροποίησης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. (1, 2)

Πώς οι ιστοί δημιουργούνται και διατηρούν τον σωστό αριθμό κυττάρων είναι ακόμη αναπάντητο ερώτημα. Η αναγέννηση των κυττάρων μπορεί να γίνει με τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων ή με τον διπλασιασμό των υπάρχοντων διαφοροποιημένων κυττάρων. Στο πάγκρεας η ανάλυση δείχνει ότι τα ήδη υπάρχοντα β κύτταρα είναι η πηγή ανανέωσης των νησιδίων και όχι τα πολυδύναμα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι τα πλήρως διαφοροποιημένα β κύτταρα διατηρούν σημαντική ικανότητα πολλαπλασιασμού *in vivo*. (3)

II. Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Η ινσουλίνη ελέγχει την είσοδο γλυκόζης και άρα ενέργειας στους περισσότερους ιστούς του οργανισμού. Επιπρόσθετα, η ινσουλίνη λειτουργεί και ως αυξητικός παράγοντας. Στους ανθρώπους περίπου 2 δισεκατομμύρια β κύτταρα καταλαμβάνουν όγκο μόλις 1-2 ml και καταφέρνουν να διατηρήσουν τη γλυκόζη πλάσματος σε επίπεδα μεταξύ 4 και 8 mM. Στους υγιείς αυτό γίνεται με ακρίβεια και ταχύτητα, παρ' όλη τη μεταβολή των γευμάτων, τη μεταβολή της φυσικής δραστηριότητας και το στρες.

Με τη λήψη φαγητού, η ινσουλίνη πλάσματος μπορεί να αυξηθεί έως 50 φορές σε μερικά λεπτά για να οδηγήσει τα θρεπτικά συστατικά στη σωστή κατεύθυνση. Όταν πλέον έχει τελειώσει το γεύμα, τα επίπεδα ινσουλίνης πέφτουν ταχύτατα ώστε να επιτρέψουν στα επίπεδα γλυκόζης να φτάσουν λίγο χαμηλότερα από το επίπεδο που είχαν πριν το γεύμα. Η ικανότητα των β κυττάρων να αναστέλλουν τη λειτουργία τους είναι αμυντικός μηχανισμός που αποτρέπει τη μεταγευματική υπογλυκαιμία.

Μεταξύ των γευμάτων παρατηρείται μία βασική έκκριση ινσουλίνης, η οποία ρυθμίζει τη γλυκόζη πλάσματος σε συγκεκριμένα και στενά όρια και ταυτόχρονα ρυθμίζει τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, των

κετονών και των αμινοξέων. Τα β κύτταρα έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να παραμένουν ενεργά σε ολόκληρη τη ζωή του ανθρώπου, παρ' όλο που ο τρόπος ζωής, πολλές φορές, οδηγεί στη δυσλειτουργία τους και στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

A. Η μοναδικότητα και τα χαρακτηριστικά των β κυττάρων

1. Σύνθεση και αποθήκευση ινσουλίνης, αμυλοειδούς πολυπεπτιδίου (IAPP). Η ινσουλίνη αντιστοιχεί περίπου στο 10% όλων των πρωτεϊνών.
2. Ρυθμιζόμενη έκκριση. Μεγάλα ποσά ινσουλίνης απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα προς απάντηση στη γλυκόζη και σε άλλους παράγοντες.
3. Διαφασική έκκριση ινσουλίνης.
4. Εξωκυττάρωση των αποθηκευμένων κυστιδίων ινσουλίνης.
5. Αναγνώριση της γλυκόζης με τη βοήθεια του υποδοχέα GLUT 2 / γλυκοκινάσης.
6. Ο διάυλος επιφανείας kir 6.2 επιτρέπει την εκπόλωση των κυττάρων.
7. Το δυναμικό L τύπου ρυθμίζει τους διαύλους ασβεστίου.
8. Κ ATP διάυλος ρυθμίζει την έκκριση γλυκόζης.
9. Ανεξάρτητη έκκριση γλυκόζης από τον Κ ATP διάυλο.
10. Η γλυκονεογένεση είναι ελάχιστη.
11. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι ελάχιστη.
12. Πολύ χαμηλή σύνθεση λιπαρών οξέων.
13. Απόκριση στο παρόμοιο-με-γλουκαγόνο πεπτιδίο-1 (GLP-1) και γλυκοζο-εξαρτώμενο ινσουλινοτρόφο πεπτιδίο (GIP), που ανήκουν στις ινκρετίνες.
14. Μεγάλη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Έχουν χαμηλά επίπεδα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης και καταλάσης.
15. Ακριβής ρύθμιση του αριθμού τους.
16. Η ρύθμιση και η διατήρηση του αριθμού των β κυττάρων προκύπτει

από πολλαπλασιασμό των υπαρχόντων β κυττάρων και από νεογένεση από βλαστικά κύτταρα. Στα τρωκτικά υπερισχύει ο πολλαπλασιασμός ενώ στους ανθρώπους η νεογένεση. (6, 7)

B. Ευπάθεια των β κυττάρων

Η συχνή εμφάνιση του διαβήτη τύπου 1 υποδεικνύει ότι τα β κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αυτοάνοση καταστροφή. Αποδεικτικό της ευαισθησίας των κυττάρων παρέχεται από τη διαπίστωση ότι η στρεπτοζοτοκίνη και η αλλοξάνη προκαλούν τον θάνατο των β κυττάρων σε συγκεντρώσεις που τα ηπατοκύτταρα και τα νεφρικά κύτταρα επιβιώνουν. Τα παραπάνω κύτταρα έχουν όλα τον GLUT2, τον μεταφορέα της γλυκόζης, ο οποίος επιτρέπει την αποτελεσματική μεταφορά αυτών των παραγόντων. Οι μηχανισμοί που προκαλούν αυτή την ευαισθησία δεν είναι γνωστοί. Ένζυμα που προστατεύουν από την οξειδωτική βλάβη είναι η γλουταθειόνη, η υπεροξειδάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση. (8)

C. Η σύνθεση και αποθήκευση της ινσουλίνης

Το κύριο προϊόν που εκκρίνουν τα β κύτταρα είναι η ινσουλίνη. Επίσης εκκρίνουν και αμυλοειδές πολυπεπτίδιο, του οποίου η λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης ξεκινά με τη δημιουργία προ-προ-ινσουλίνης, η οποία σύντομα μετατρέπεται σε προ-ινσουλίνη και στη συνέχεια οι πεπτιδάσες τη μετατρέπουν σε ινσουλίνη και C πεπτίδιο.

Τα β κύτταρα έχουν εντυπωσιακή ικανότητα να αποθηκεύουν την ινσουλίνη. Περίπου το 10% όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών αποτελεί η ινσουλίνη. Ένα μοναδικό β κύτταρο περιέχει 13.000 κοκκία ινσουλίνης, συνολικής ποσότητας 20 pg. Η διατήρηση των αποθηκών ινσουλίνης γίνεται με μεταγραφή του DNA και αυτό επιτρέπει τη γρήγορη αναπλήρωση των κοκκίων μετά τη χρήση τους στα γεύματα. Η μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης φαίνεται ότι είναι ενεργή τις περισσότερες ώρες της ημέρας. Οι μηχανισμοί της αποθήκευσης των κοκκίων και της μετακίνησής τους φαίνεται ότι είναι πολύπλοκοι. (9, 10)

Η απελευθέρωση της ινσουλίνης από τα β κύτταρα γίνεται κυρίως μετά από τα γεύματα, ενώ η συνεχής βασική απελευθέρωση είναι σχεδόν αμελητέα. Η πρώτη φάση της έκκρισης διαρκεί περίπου 6 λεπτά σε ανταπόκριση της αύξησης των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος. Αυτή η πρώιμη φάση είναι πολύ σημαντική για την αποφυγή της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, 20 λεπτά μετά τη λήψη γεύματος.

Η δεύτερη φάση της έκκρισης ινσουλίνης που εκλύεται από τη συνέργεια της γλυκόζης, των εντερικών ορμονών και των αμινοξέων είναι κρίσιμη για την εναπόθεση ενέργειας στους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς. Ακόμη και σε περιόδους νηστείας βρέθηκε ότι η ινσουλίνη εκκρίνεται περιοδικά κάθε

10 με 13 λεπτά. (11)

D. Γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης

Η ρυθμιζόμενη έκκριση ινσουλίνης προέρχεται από έναν πραγματικά μοναδικό μηχανισμό που έχει και ταχύτητα και ακρίβεια. Για να το πετύχει αυτό ο υποδοχέας της μεμβράνης GLUT 2 έχει μεγάλη χωρητικότητα για τη γλυκόζη και προκαλεί γρήγορη εξίσωση μεταξύ της εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας συγκέντρωσης. Αυτός ο υποδοχέας υπάρχει και στο ήπαρ, εγκέφαλο και νεφρό, αλλά δεν προκαλεί τα ίδια αποτελέσματα. (12)

Δύο μονοπάτια προκαλούν τη γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης [Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)]: πρώτον μέσω του διαύλου K ATP και δεύτερον μέσω της παραγωγής NADH. Επίσης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα FFA είναι σημαντικά για τη βασική έκκριση ινσουλίνης στη νηστεία. Τα β κύτταρα έχουν χαμηλό ρυθμό σύνθεσης ελεύθερων λιπαρών οξέων. Παρ' όλα αυτά έχουν αποθήκες τριγλυκεριδίων και κάνουν λιπόλυση. (13, 14)

Στο πρώτο μονοπάτι ο μεταβολισμός γλυκόζης αυξάνει την αναλογία ATP/ADP με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η αποβολή καλίου από τον δίαυλο Kir 6.2 και αυτό να προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση των L διαύλων ασβεστίου που εξαρτώνται από το δυναμικό της μεμβράνης. Έτσι αυξάνει το ενδοκυτταρικό ασβέστιο και προκαλείται η εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης. Η γλυκόλυση γίνεται άμεσα χωρίς καμία παρεμβολή και το πυρουβικό εισέρχεται στα μιτοχόνδρια χωρίς να μετατραπεί σε γαλακτικό από τη γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH) ή να υπάρξει γλυκονογένεση. Η ποσότητα LDH στα β κύτταρα είναι ελάχιστη. (15, 16)

Στο δεύτερο μονοπάτι, η φωσφορική γλυκερόλη επιτρέπει στο NADH να οξειδωθεί στα μιτοχόνδρια και να σχηματιστεί ATP. Το μηλικό και το πυρουβικό οξύ μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα του NADPH και μετέπειτα του ATP. Η ανάγκη για παραγωγή NAD και NADPH εξηγεί γιατί τα μιτοχόνδρια των β κυττάρων έχουν υψηλή φωσφορική δεϋδρογονάση της γλυκερόλης (mGPDH) και πυρουβική καρβοξυλάση. (17-20)

III. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) περιλαμβάνει μια ομάδα με κοινές μεταβολικές διαταραχές και κύριο γνώρισμα την υπεργλυκαιμία και την έλλειψη ινσουλίνης. Οι μεταβολικές διαταραχές που συνδέονται με τον σακχαρώδη διαβήτη επιβαρύνουν την υγεία του ασθενούς, αλλά και το σύστημα υγείας. Ο σακχαρώδης διαβήτης συνδέεται με εμφάνιση μικροαγγειοπάθειας (νεφροπάθειας, νευροπάθειας, αμφιβληστροειδοπάθειας)

και μακροαγγειοπάθειας και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι κύρια αιτία τελικού σταδίου νεφρικής νόσου (End Stage Renal Disease), μη τραυματικού ακρωτηριασμού κατώτερου άκρου και τύφλωσης των ενηλίκων. Με την όλο και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως, ο σακχαρώδης διαβήτης θα αποτελέσει πολύ σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στο άμεσο μέλλον (World Health Organization).

E. Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός της νόσου έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Σε αυτό συντελούν η αύξηση της παχυσαρκίας, η αυξημένη επιβίωση του πληθυσμού και η μειωμένη φυσική δραστηριότητα. Επίσημα στοιχεία παρουσιάζουν πενταπλασιασμό του επιπολασμού τα τελευταία 15 χρόνια, ενώ υπολογίζονται πάνω από 170 εκατομμύρια άτομα με σακχαρώδη διαβήτη το 2001 και εκτιμάται ότι ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 300 εκατομμύρια μέχρι το 2025. Από επίσημα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization) παρουσιάζεται ότι στην Ελλάδα το έτος 2000 υπήρχαν 853.000 άτομα με σακχαρώδη διαβήτη και το ποσοστό αυτό αναμένεται να αυξηθεί σε 1.077.000 άτομα το έτος 2030.

F. Ο διαβήτης τύπου 1

Ο διαβήτης τύπου 1 προκαλείται από καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος από T-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με συνέπεια τη χαμηλότερη παραγωγή ινσουλίνης. Η παγκόσμια αύξηση του τύπου 1 διαβήτη έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την εύρεση μηχανισμών που μπορούν να αυξήσουν την ενεργό έκκριση ινσουλίνης. Οι διάφορες προσπάθειες να λυθεί αυτή η πρόκληση έχουν γίνει μέσω της ενδογενούς αναγέννησης των νησιδίων και μέσω της μεταμόσχευσης των νησιδίων. (4, 5)

G. Ο διαβήτης τύπου 2

Ο προδιαβήτης στα αρχικά στάδια χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκκριση ινσουλίνης και σταδιακή μείωση στην προϊνσουλίνη του ορού. Στη συνέχεια, ανατρέπεται αυτή η αναλογία και υπερισχύει η προϊνσουλίνη. Η πρώιμη έκκριση ινσουλίνης μετά τη λήψη τροφής είναι η πρώτη που διαταράσσεται στον διαβήτη τύπου 2. (21)

Ο φαύλος κύκλος της δυσλειτουργίας των β κυττάρων περιλαμβάνει το οξειδωτικό στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο συνεπάγεται την τοπική αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών που οδηγεί σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και επακόλουθη επιδείνωση ξανά από την αρχή. Αν δεν περιοριστεί η φλεγμονώδης διαδικασία, τότε οδηγεί σταδιακά σε απόπτωση

των κυττάρων. (22)

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται σε υπερλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου λόγω αυξημένων αναγκών του οργανισμού για έκκριση πρωτεΐνης. Η ανάγκη του οργανισμού για έκκριση ινσουλίνης δεν επιτρέπει στο β κύτταρο να «καθαρίσει» το ενδοπλασματικό δίκτυο από τις ανώμαλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν. Η προΐνσουλίνη είναι επιρρεπής σε ανώμαλη αναδίπλωση. Υπολογίστηκε ότι το 20% της προΐνσουλίνης σε υγιή β κύτταρα αναδιπλώνεται ανώμαλα, δηλαδή δεν έχει τη σωστή τρισδιάστατη δομή. Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου προκαλείται όταν οι πρωτεΐνες συντίθενται κανονικά, αλλά αναδιπλώνονται ανώμαλα σε μεγάλο ποσοστό. (23, 24, 25)

Η γλυκολιποτοξικότητα προκαλείται από την υπεργλυκαιμία και την υπερλιπιδαιμία. Ο υπερκαταβολισμός της γλυκόζης παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, τα λιπαρά οξέα μειώνουν το pH του αίματος λόγω του μεταβολισμού τους σε κετόνες. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, όπως το παλμιτικό, προκαλούν τη βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου στα μιτοχόνδρια και επιφέρουν φλεγμονή στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Αποτελεί αντικείμενο συζήτησης ποια είναι η κυρίαρχη διαταραχή στον διαβήτη τύπου 2. Είναι η μειωμένη ικανότητα των β κυττάρων να εκκρίνουν ινσουλίνη ή είναι ο ελαττωμένος αριθμός των β κυττάρων; Είναι πιθανό η μειωμένη ικανότητα των β κυττάρων για παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης να είναι η κυρίαρχη διαταραχή μέσω του παραπάνω μηχανισμού. Αυτό υποστηρίζεται και από μελέτες ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που δείχνουν ότι έχουν υπολειπόμενη μάζα β κυττάρων 40% το ελάχιστο. Επίσης ασθενείς με 50% αφαίρεση του παγκρέατος δεν έχουν μεγάλη διακύμανση στη γλυκόζη αίματος. (26, 27)

IV. ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στις αρχές του 20ού αιώνα γεννήθηκε η θεωρία της ύπαρξης αρχέγονων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (stem cells). Κατά τη διάρκεια των επομένων ετών εδραιώθηκε η άποψη ότι η αναγέννηση των διαφόρων ιστών (έντερο, δέρμα, μυς) βασίζεται στην ύπαρξη, μέσα στους ιστούς, ενός μικρού πληθυσμού βλαστικών κυττάρων (stem cells) από τα οποία προέρχονται τα ώριμα κύτταρα των ιστών αυτών. Τα ελάχιστα κριτήρια που καθορίζουν την πλαστικότητα των βλαστικών κυττάρων είναι: πρώτον η διαφοροποίηση ενός κυττάρου σε κύτταρα πολλών σειρών, δεύτερον τα κύτταρα να είναι λειτουργικά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και τρίτον τα κύτταρα να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα ενεργά μετά τη μεταμόσχευσή τους. (28)

H. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Κάθε πολυκύτταρος οργανισμός προέρχεται από ένα παντοδύναμο κύτταρο (ζυγωτό) το οποίο μέσα από διαδοχικούς κύκλους διαίρεσης και διαφοροποίησης δίνει γένεση σε όλους τους ιστούς του ώριμου οργανισμού (Embryonic Stem Cells - ESC). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (Inner Cell Mass - ICM) εμβρύων, πριν από την εμφύτευση στη μήτρα. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES) χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα.

I. Σωματικά βλαστικά κύτταρα

Η ύπαρξη αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων δεν περιορίζεται στο εμβρυϊκό περιβάλλον. Τα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε ώριμους ιστούς και όργανα (σωματικά βλαστικά κύτταρα) μπορεί να οριστούν ως λειτουργικές αναπαραγωγικές μονάδες υπεύθυνες για την αναγέννηση και την ανάπτυξη των ιστών και των οργάνων του σώματος. Κατέχουν δύο βασικές ιδιότητες: την ιδιότητα της ανανέωσης, μέσω του μηχανισμού της κυτταρικής διαίρεσης, και της διαφοροποίησης προς διάφορες κατευθύνσεις. Ωριμοί ιστοί όπως η επιδερμίδα, το έντερο, το ήπαρ, το αιμοποιητικό σύστημα περιέχουν βλαστικά κύτταρα τα οποία, είτε εξαιτίας του φυσιολογικού μηχανισμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) είτε λόγω βλάβης, δίνουν γένεση σε νέα κύτταρα. Αυτά με τη σειρά τους διαφοροποιούνται, διαιρούνται και τελικά αποπίπτουν.

Παρά την ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης που κατέχουν τα σωματικά βλαστικά κύτταρα, θεωρήθηκε ότι η ικανότητα διαφοροποίησής τους περιορίζεται σε κύτταρα των ιστών εντός των οποίων βρίσκονται. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι βλαστικά κύτταρα από έναν ιστό μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετική οδό διαφοροποίησης, όταν βρεθούν σε περιβάλλον ή δεχθούν την επίδραση κατάλληλων αυξητικών παραγόντων και να μετατραπούν σε ώριμα κύτταρα άλλων ιστών ή οργάνων. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως πλαστικότητα των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (stem cell plasticity). Η παρατήρηση ότι το φαινόμενο της πλαστικότητας δεν είναι αποκλειστικό προνόμιο των εμβρυϊκών πολυδύναμων κυττάρων, αλλά επιτυγχάνεται και από σωματικά βλαστικά κύτταρα αποτελεί ένα από τα πιο εντυπωσιακά βιολογικά φαινόμενα. Παρότι το βλαστικό κύτταρο εμφανίζει υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, βρίσκεται συνήθως σε μια λανθάνουσα κατάσταση.

J. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Haematopoietic Stem Cells – HSC) ήταν τα πρώτα βλαστικά κύτταρα των θηλαστικών τα οποία μελετήθηκαν εκτενώς. Ανήκουν στα σωματικά βλαστικά κύτταρα. Το 1961 ανακαλύφθηκε ένας πληθυσμός από πρόδρομα κύτταρα στον μυελό των οστών, ο οποίος μπορούσε να αναπαραγάγει όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος, όταν μεταμοσχευόταν στον σπλήνα πειραματόζωνων τα οποία είχαν ακτινοβοληθεί. Ο πληθυσμός αυτός ονομάστηκε CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen). Η ανακάλυψη αυτή άνοιξε νέους ορίζοντες στη θεραπευτική προσέγγιση των νοσημάτων του αίματος, ιδιαίτερα των κακοήθων νεοπλασιών, με τη δυνατότητα μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε πάσχοντα λήπτη.

Η οδός αυτή της διαφοροποίησης (αρχέγονο βλαστικό πολυδύναμο κύτταρο > δεσμευμένο προγονικό κύτταρο > διαφοροποιημένο κύτταρο) θεωρήθηκε για πολλά χρόνια ότι κινείται προς μία μόνον κατεύθυνση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν συγκεντρώσει νεότερα ερευνητικά δεδομένα τα οποία φανερώνουν την ικανότητα των σωματικών βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε κύτταρα άλλων ιστών και οργάνων, όταν βρεθούν στο κατάλληλο περιβάλλον.



Εικόνα 1. Αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο.

προέρχονται από ανθρώπινα έμβρυα, αίμα ομφάλιου λώρου ή εμβρυϊκούς ιστούς που προέρχονται από in vitro γονιμοποιημένα ωάρια. Όπως γίνεται αντιληπτό η χρήση αυτών των κυττάρων προκαλεί σημαντικά ηθικά και νομικά ερωτήματα. Είναι πιθανό να απορριφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Μπορούν ακόμη να προκαλέσουν ογκογένεση. (29, 30)

2. Σωματικά βλαστικά κύτταρα

Τα ενήλικα CD 34+ αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα είναι γνωστά για την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και την ικανότητα για διαφοροποίηση σε κύτταρα όλων των αιμοποιητικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους – μονοκυτταρικής σειράς. Με τη σειρά τους, αυτά τα προγονικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαφοροποιηθούν σε κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα και να σχηματίσουν αποικίες (Colony Forming Units). Υπό την επίδραση διαφοροποιητικών παραγόντων της αποικίας, τα προγονικά μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, μυελοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και οστεοκλάστες. (31)

3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Ένας τρόπος να παρακαμφθούν τα παραπάνω προβλήματα είναι η χρήση αυτόλογων πολυδύναμων κυττάρων, κατά προτίμηση από έναν εύκολα προσβάσιμο ιστό. Μία πρόσφατη μελέτη των βλαστικών μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών έδειξε ότι μπορούν να πολλαπλασιαστούν in vitro και να μεταμοσχευθούν στη συνέχεια. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που ανήκουν και στα τρία εμβρυϊκά δέρματα in vivo. Άλλες μελέτες θέτουν το ερώτημα αν τα κύτταρα αυτά όντως διαφοροποιήθηκαν ή προήλθαν από τη σύντηξη βλαστικών κυττάρων με ώριμα κύτταρα των ιστών. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC) έχουν χαρακτηριστεί ως κύτταρα που μοιάζουν στους ινοβλάστες και έχουν ικανότητα προσκόλλησης. Βρίσκονται στον μυελό των οστών και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους μεσεγχυματικούς ιστούς, όπως είναι το οστό, ο χόνδρος, το λίπος, οι μύες και το στρώμα του μυελού. (32-35)

L. Δημιουργία β κυττάρων

Η πρόσφατη βιβλιογραφία περιγράφει πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μέσα στο πάγκρεας, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν στις παγκρεατικές δομές των νησιδίων. Επιπλέον, άλλοι τύποι κυττάρων, όπως τα ηπατικά ωοειδή κύτταρα και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, είναι επίσης σε θέση να διαφοροποιηθούν στα παγκρεατικά ενδοκρινή ορμονο-παραγωγά κύτταρα in vivo και in vitro. (36-39)

1. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Η προσπάθεια για να αναπτυχθούν β κύτταρα από εμβρυϊκά κύτταρα έχει στεφθεί με επιτυχία. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν πολύ μικρά ποσά ινσουλίνης, όταν όμως εμφυτεύονται σε ποντικούς καταφέρνουν να μειώσουν τη γλυκόζη πλάσματος. Τα αποτελέσματα είναι κατώτερα σε σχέση με την εμφύτευση κανονικών β κυττάρων. Άρα δεν είναι εφικτή η πλήρης διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων. (39-43)

2. Σωματικά κύτταρα

Η προσπάθεια για διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων προς β κύτταρα ευνοείται χάρη στην κοινή καταγωγή τους από το ενδόδερμα. Η εισαγωγή γονιδίων όπως το PDX-1, Neuro-D και Beta-cellulin έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. (44-48)

Με τη χρησιμοποίηση του παγκρεατικού και δωδεκαδακτυλικού homeobox γονιδίου-1 (PDX-1) μπορεί να προκληθεί μία αλλαγή στα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα και να μετατραπούν σε κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Τα αρχικά ηπατικά κύτταρα δέχθηκαν επιδράσεις από το PDX-1 γονίδιο και εξέφρασαν το γονίδιο της ινσουλίνης. Στη συνέχεια αποθήκευσαν σε κοκκία την ινσουλίνη και την έκκριναν ανάλογα με τα επίπεδα γλυκόζης αίματος. Όταν μεταμοσχεύθηκαν στη νεφρική κάψα ανοσο-ανεπαρκών ποντικών, κατάφεραν να μειώσουν την υπεργλυκαιμία για μεγάλες χρονικές περιόδους. (49)

Ακόμη, δοκιμάστηκε η προσθήκη ορισμένων ενζύμων μέσα στο κυτταρόπλασμα κυττάρων υπόφυσης. Η προσθήκη του υποδοχέα GLUT-2 και της γλυκοκινάσης προκάλεσε στα κύτταρα μικρή έκκριση γλυκοζο-εξαρτώμενης ινσουλίνης. Η συνολική απόδοση ήταν πολύ κατώτερη από αυτή των β κυττάρων. Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς ο πολύπλοκος μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης των β κυττάρων δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την προσθήκη μερικών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα. (50, 51)

Σε πρόσφατα πειράματα έγινε προσπάθεια για διαφοροποίηση των K κυττάρων του εντέρου που φυσιολογικά παράγουν το GIP, προς κύτταρα ινσουλινο-παραγωγά. Τα K κύτταρα ανταποκρίνονται φυσιολογικά στις μεταβολές των θρεπτικών συστατικών. Άρα έχουν έτοιμο τον μηχανισμό ρύθμισης της έκκρισης. Η προσπάθεια εστιάστηκε ώστε αντί για GIP να εκκρίνουν ινσουλίνη. Αλλά είναι πολύ δύσκολο αυτά τα κύτταρα να παράγουν και τη βασική έκκριση ινσουλίνης ανάμεσα στα γεύματα. (52)

Μεταμόσχευση νησιδίων του παγκρέατος έχει αποδείξει ότι η μακροπρόθεσμη ανεξαρτησία από την ινσουλίνη μπορεί να επιτευχθεί σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των νησιδίων, η εύρεση νέων ινσουλινο-παραγωγών κυττάρων είναι αναγκαία. Η ανάπτυξη των παγκρεατικών β

κυττάρων από κύτταρα τρωκτικών ή ανθρώπινης προέλευσης προχώρησε τα τελευταία χρόνια. Τα τρέχοντα πειράματα οδήγησαν σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, τα κύτταρα που παράγονται έως σήμερα έχουν έλλειψη σημαντικών χαρακτηριστικών των ώριμων β κύττάρων και γενικά εμφανίζουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Επομένως, είναι απαραίτητη η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την επέκταση και τη διαφοροποίηση των βλαστικών / πρόδρομων κυττάρων. (53)

3. Μεσεγχυματικά κύτταρα από τον μυελό των οστών

Τα κύτταρα μυελού των οστών (Bone Marrow-BM) έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε ποικίλους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινών κυττάρων του παγκρέατος. Αυτά τα κύτταρα, όταν μεταμοσχευθούν σε ποντικούς, παίρνουν την αρχιτεκτονική μορφή των νησιδίων του Langerhans. Αυτά τα σύνολα κυττάρων παρουσίασαν ενδοκρινή έκφραση γονιδίων για την ινσουλίνη (I και II), γλουκαγόνο, τη σωματοστατίνη και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Η ανοσοϊστοχημεία επίσης επιβεβαίωσε ότι αυτά τα σύνολα ήταν θετικά για την ινσουλίνη, τη σωματοστατίνη, παγκρεατικό πολυπεπτίδιο και το γ-πεπτίδιο. Επίσης, η western blot και η ανάλυση ELISA κατέδειξαν την έκφραση προϊνσουλίνης και την έκκριση της ενεργού ινσουλίνης έπειτα από χορήγηση γλυκόζης. (54)

Η υποκάψια νεφρική μεταμόσχευση αυτών των συνόλων κυττάρων στα υπεργλυκαιμικά ποντίκια χαμήλωσε τα κυκλοφορούντα επίπεδα γλυκόζης αίματος και διατήρησε κανονικά επίπεδα γλυκόζης μέχρι και 90 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Η αφαίρεση του μοσχεύματος οδήγησε στη γρήγορη υποτροπή και τον θάνατο στα πειραματόζωα. Επιπλέον, η μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι αυτά τα σύνολα είχαν αποκτήσει μικροδομή που σχετίζεται με τα ώριμα β κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα ενήλικα κύτταρα του μυελού των οστών είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν σε μια παγκρεατική σειρά *in vitro* και μπορούν να αποτελούν επιλογή για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. (54)

Τα παραγόμενα κύτταρα από τον μυελό των οστών μπορούν να διαφοροποιηθούν αποτελεσματικά σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα, όπως επίσης και άλλους τύπους κυττάρων, χαρακτηριστικούς της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν δομές που μοιάζουν με τα παγκρεατικά νησίδια και στο οπτικό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μπορούν να αναστρέψουν την υπεργλυκαιμία σε διαβητικά-μη-παχύσαρκα και ανοσοανεπαρκή ποντίκια. (55)

Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνονται και από τρίτη μελέτη σχετικά με την ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων του μυελού των οστών προς κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος και την *in vivo* εμφύτευση και λειτουργία

τους. Τα πειράματα έγιναν σε ποντικούς και η μεταμόσχευση των νησιδίων έγινε στο ήπαρ, διαμέσου της πυλαίας φλέβας. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, μετά την επίδραση κατάλληλων παραγόντων, ανέπτυξαν σφαιροειδείς σχηματισμούς με υψηλή έκφραση CD 90, CD 29 και χαμηλή έκφραση CD 45. Τα κύτταρα που περιείχαν ινσουλίνη ανήλθαν στο 19,8%, όπως έδειξε η ανοσοϊστοχημεία. Μπορούσαν να αυξήσουν την παραγωγή γλυκόζης κατά 1,5 φορά ύστερα από φόρτιση με γλυκόζη. Μετά τη μεταμόσχευση στο ήπαρ τα κύτταρα αυτά μπορούσαν να μειώσουν το σάκχαρο των διαβητικών ποντικών μεταξύ της έκτης και της εικοστής ημέρας.

Για να διαφοροποιηθούν τα μεσεγχυματικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 5% FBS, 25 mmol/lit γλυκόζη για 14 ημέρες, 10 mmol/lit νικοτιναμίδιο για 7 ημέρες και εξενατίδη-4 για 7 ημέρες. Η παραγωγή της ινσουλίνης επιβεβαιώθηκε με ανοσοφθορισμό, ηλεκτρονική μικροσκοπία και RT-PCR. Το πάγκρεας στα θηλαστικά προέρχεται από όζους του ενδοδέρματος που διαφοροποιούνται σε ενδοκρινικά κύτταρα με την ενεργοποίηση των γονιδίων PDX-1, Ngn, NeuroD1, PAX-6, PAX-4, Nkx2.2, Nkx6.1 και άλλων και τελικά σχηματίζουν το πάγκρεας. (12, 13)

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι πολυδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε σειρές μεσεγχυματικών ιστών, ενδοδερμικών ιστών και επιδερμικών ιστών, όπως είναι τα κύτταρα των τενόντων, τα μυϊκά κύτταρα, τα λιποκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα οστεοκύτταρα, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, οι νευρώνες, τα κύτταρα του πνεύμονα και τα ηπατοκύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μελέτες που δείχνουν ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα. Η βασική αρχή των μεθόδων τους είναι να επάγουν τη μετάφραση του PDX-1. Στο συγκεκριμένο πείραμα με PCR ανιχνεύθηκε το mRNA ινσουλίνης, γλουκαγόνου, παγκρεατικού πολυπεπτιδίου, PDX-1, Ngn3, NeuroD1, PAX-6 και GLUT-2. Όμως η έκκριση ινσουλίνης είναι μικρή και η απάντηση στην αύξηση της γλυκόζης είναι επίσης μικρή, συγκρινόμενη με τα β κύτταρα. (56)

4. Κύτταρα του ομφάλιου λώρου

Διαπιστώθηκε η δυνατότητα των βλαστικών κυττάρων του αίματος του ομφάλιου λώρου να παράγουν C πεπτίδιο και ινσουλίνη. Τα κύτταρα CD133+ και CD34+ αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για να αξιολογηθεί η έκφραση των αντιγόνων κυτταροδιαίρεσης. Το οπτικό μικροσκόπιο και ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιήθηκαν για να χαρακτηρίσουν τους δείκτες διαφοροποίησης με την ιδιαίτερη έμφαση στην ινσουλίνη και το c-πεπτίδιο. Μετά από την καλλιέργεια διαφοροποίησης, τα κύτταρα εξέφρασαν c-πεπτίδιο και ινσουλίνη. (57)

V. ΜΕΓΑΛΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ Ή ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Με τον όρο μονοπύρηνα αναφερόμαστε στη μικτή ομάδα μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων. Με τον όρο Μεγάλα Μονοπύρηνα αναφερόμαστε αποκλειστικά στα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα ανήκουν στα λευκά αιμοσφαίρια και συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις και ανοσιακές απαντήσεις. Παράγονται στον μυελό των οστών και αντιστοιχούν στο 4% – 10% του συνόλου των λευκών αιμοσφαιρίων. Θεωρείται ότι τα λευκά αιμοσφαίρια προέρχονται από ένα κοινό προγονικό βλαστικό κύτταρο. Η παραγωγή τους ελέγχεται από παράγοντες γνωστούς ως Παράγοντες-που-Διεγείρουν τον Σχηματισμό-Αποικιών (Colony Stimulating Factors) και από τις Ιντερλευκίνες (Interleukins).

Η γραμμή της ανάπτυξής τους διαχωρίζεται νωρίς από την κοκκιώδη σειρά, δεν διαθέτει όμως διακριτούς και συγκεκριμένους προγόνους που μπορούν να ταυτοποιηθούν με ασφάλεια με τις συνήθεις μορφολογικές μελέτες. Τα ώριμα μονοκύτταρα είναι τα πιο ποικιλόμορφα κύτταρα, χάρη στην έντονη κινητικότητα και την τάση για προσκόλληση που διαθέτουν. Έχουν μέγεθος μεταξύ 20 και 40 μm, ωοειδή πυρήνα και συνήθως ανώμαλο περίγραμμα με κυτταροπλασματικές προεκβολές σαν ψευδοπόδια. Η χρωματίνη του πυρήνα τους έχει λεπτή και έντονη δομή και αυτό επιτρέπει τον διαχωρισμό τους από τα μυελοκύτταρα, που η χρωματίνη τους έχει τμηματική και ραβδωτή δομή, και από τα λεμφοκύτταρα, που έχουν πυκνό και ομοιογενή πυρήνα. (58)

Τα μονοκύτταρα είναι ανώριμα φαγοκυτταρικά κύτταρα του αίματος που έχουν την ικανότητα να εσωκλείουν τα μικρόβια και τα αιωρούμενα σωματίδια. Τα μονοκύτταρα ανήκουν στη μη ειδική κυτταρική ανοσιακή απάντηση του οργανισμού. Έπειτα από σύντομο χρονικό διάστημα στην αιματική κυκλοφορία, ωριμάζουν σε μακροφάγα και μεταναστεύουν στους ιστούς. Τα μακροφάγα είναι μεταναστευτικά κύτταρα που βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς του σώματος και είναι απαραίτητα τόσο για τη μη ειδική ανοσία, αλλά και για την προσαρμογή της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Φαγοκυτταρώνουν τα μικρόβια και εκθέτουν τα κυτταρικά υπολείμματα με τους υποδοχείς τους ώστε να ενεργοποιηθούν τα λεμφοκύτταρα.

Τα μονοκύτταρα παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος για 12 με 24 ώρες και στη συνέχεια με διαπίδυση μπαίνουν στους ιστούς του οργανισμού. Εκεί διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και μπορούν να φαγοκυτταρώνουν κύτταρα και τοξίνες, να εκκρίνουν κυτταροκίνες και πολλές άλλες ουσίες, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες του οργανισμού.

Τα μακροφάγα βρίσκονται κυρίως στα τριχοειδή του πνεύμονα, στον σπλήνα, στο ήπαρ, στον μυελό των οστών, όπου φαγοκυτταρώνουν

μικροοργανισμούς και άλλα βλαπτικά στοιχεία. Τα μακροφάγα των ιστών αποτελούν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του οργανισμού και εκκρίνουν λυσοζύμη, όξινες υδρολάσες, αργινάση, συστατικά του συμπληρώματος, αναστολείς ενζύμων (πλασμίνη, 2-μακροσφαιρίνης), δεσμευτικές πρωτεΐνες (τρανσφερίνη, φμπρονεκτίνη, τρανσκοβαλαμίνη II), νουκλεοσιδάσες, κυτταροκίνες (TNF, IL-1, -8, -12, -18).

Άλλα προϊόντα των μονοκυττάρων είναι ενεργοί μεταβολίτες του οξυγόνου και του αζώτου, βιοενεργά λιπίδια (μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος και παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων), χυμοκίνες, Παράγοντες-που-Διεγείρουν τον Σχηματισμό-Αποικιών (Colony Stimulating Factors) και παράγοντες που διεγείρουν τους ινοβλάστες και τον πολλαπλασιασμό των αγγείων. (59)

Όπως γίνεται φανερό, τα μονοκύτταρα έχουν πάρα πολλές δυνατότητες και επηρεάζουν πάρα πολλές λειτουργίες του οργανισμού για να μπορέσουν να επιτελέσουν τον πρωταρχικό τους σκοπό, που είναι ο καθαρισμός του οργανισμού από βλαπτικούς παράγοντες.

M. Υποδοχείς μεταφοράς γλυκόζης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων

Οι τύποι GLUT μεταφορέων γλυκόζης (Glucose transporters) που είναι παρόντες στη μεμβράνη των ανθρώπινων μονοκυττάρων είναι τρεις (GLUT1, GLUT3, και GLUT4). Τα μονοκύτταρα χρειάζονται ινσουλίνη για να αυξήσουν τους υποδοχείς που έχουν στην επιφάνειά τους. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να προσλάβουν γρηγορότερα γλυκόζη. Η ινσουλίνη σε χαμηλές δόσεις 20 mU/L αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης και τον αριθμό των GLUT3 και GLUT4 υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, αλλά δεν επηρεάζει καθόλου τον αριθμό των GLUT1 υποδοχέων. (60-62)

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί από πειράματα με απομονωμένους in vitro ιστούς. Στον μυϊκό ή τον λιπώδη ιστό η άνοδος στη συγκέντρωση της ινσουλίνης μέσα στα φυσιολογικά όρια (0-100 mU/L) προκαλεί αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης (μετρημένη με ραδιενεργά ανάλογα γλυκόζης) κατά 300% έως 400%. (63, 64)

N. Διαφοροποίηση των μεγάλων μονοπυρήνων

Τα μονοκύτταρα του αίματος προέρχονται από τα βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα. Είναι δεσμευμένα να διαφοροποιηθούν προς φαγοκύτταρα κατά τη μετακίνησή τους από τον μυελό των οστών προς τους ιστούς. (65)

Φαγοκύτταρα χαρακτηρίζονται τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, οι οστεοκλάστες, τα κύτταρα του Kupffer και τα μικρογλοιακά κύτταρα. (66-68)

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η πεποίθηση ότι η ικανότητα

διαφοροποίησης των μονοκυττάρων περιορίζεται μόνο σε φαγοκύτταρα. Όμως φαίνεται ότι όλα τα παραπάνω δεν ισχύουν. Πρόσφατα έχει ανακοινωθεί διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς ομοιάζοντα ενδοθηλιακά κύτταρα με την επίδραση αγγειογενετικών παραγόντων. (69, 70)

Επίσης ανακοινώθηκε η έκφραση οστικής αλκαλικής φωσφατάσης από ένα μοντέλο μονοκυτταρικού κοκκιώματος. (71)

Μελετήθηκε η δυνατότητα της παραγωγής δενδριτικών κυττάρων από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα πειράματα έδειξαν ότι τα κύτταρα εμφάνισαν χαρακτηριστικά δενδριτικών κυττάρων. Έχασαν την έκφραση του CD14 και απέκτησαν την έκφραση του CD83 που είναι τυπικός δείκτης ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων. Το αντιγόνο CD1a εκφράζεται στα κύτταρα του Langerhans και τα κύτταρα του περιφερικού αίματος δεν το εξέφρασαν. Όμως στην καλλιέργεια με GM-CSF και IL-4 τα μονοκύτταρα εξέφρασαν CD1a αντιγόνο καθώς διαφοροποιούνταν σε δενδριτικά και στη συνέχεια μειώθηκε αυτή η έκφραση καθώς τα κύτταρα ωριμάζαν. Φαίνεται ότι για την έκφραση του CD1a αντιγόνου συντελεί και η αλβουμίνη 2% που περιείχαν οι καλλιέργειες. Παρ' όλο που το CD1a είναι δείκτης ανώριμων δενδριτικών κυττάρων, έχει ανακοινωθεί ότι και πλήρως ώριμα δενδριτικά κύτταρα φέρουν αυτόν τον δείκτη επιφανείας. (72)

O. Πολυδύναμα κύτταρα από μονοκύτταρα (monocyte-derived multipotential cells, MOMCs)

Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα θεωρείται ότι είναι δεσμευμένες προγονικές σειρές των φαγοκυττάρων, όπως είναι τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ένας προγονικός ανθρώπινος πληθυσμός κυττάρων που ονομάζονται Πολυδύναμα Κύτταρα που Προέρχονται από τα Μονοκύτταρα (MOMC), τα οποία έχουν μορφολογία σαν ινοβλάστες και μοναδικό φαινότυπο με δείκτες επιφανείας θετικούς για το CD14, CD45, CD34 και κολλαγόνο τύπου I.

Αυτός ο καινούργιος τύπος κυττάρου παρουσιάζει μικτά μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα MOMCs προέρχονται από τα κυκλοφορούντα CD14(+) μονοκύτταρα. Για να επιτύχουν τη διαφοροποίησή τους απαιτείται δέσμευση στη φιμπρονεκτίνη και έκθεση σε έναν ή περισσότερους διαλυτούς παράγοντες που προέρχονται από CD14(-) κύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα MOMCs περιέχουν κύτταρα με ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μια ποικιλία μη φαγοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων των οστών, χόνδρων, λιπώδους ιστού, σκελετικών και καρδιακών μυών, νευρώνων και ενδοθηλίου.

Τα MOMCs μπορούν να δημιουργηθούν, αν καλλιεργηθούν τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος *in vitro* σε ινωδονεκτίνη, ορό από

έμβρυο μόσχου (fetal bovine serum) και αυξητικούς παράγοντες. Βρέθηκε ότι για να παραχθούν τα MOMCs θα πρέπει να συνδεθούν τα μονοκύτταρα στην ινωδονεκτίνη και να εκτεθούν σε διαλυτούς παράγοντες που παράγουν τα CD4(-) κύτταρα. Τα MOMCs παρουσιάζουν μικτή μορφολογία και μοριακά χαρακτηριστικά μεταξύ μονοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων και μεσεγχυματικών κυττάρων. Οι δείκτες επιφανείας τους είναι CD14(+) , CD45(+), CD34(+) και τύπου I κολλαγόνο(+). Με την προσθήκη κατάλληλων παραγόντων τα MOMCs εξέφρασαν γονίδια και διαφοροποιήθηκαν προς οστεοβλάστες, σκελετικούς μυοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά είναι η πρώτη ένδειξη ότι τα κυκλοφορούντα CD14(+) μονοκύτταρα συνιστούν πηγή κυττάρων που παρουσιάζουν μεσεγχυματική διαφοροποίηση. (73)

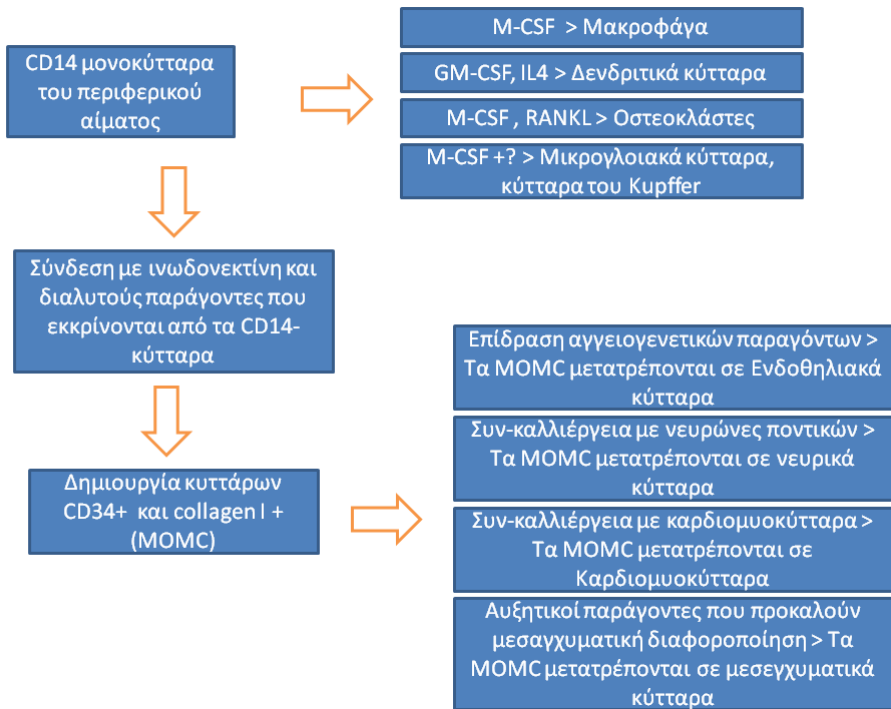
Τα MOMCs μπορούν να διαφοροποιηθούν στη μεσεγχυματική και νευρική σειρά. Αν καλλιεργηθούν με αυξητικούς αγγειογενετικούς παράγοντες για 7 ημέρες, τότε δημιουργούν δομές που ομοιάζουν με τη μορφολογία μικροσωληναρίων. Σχεδόν σε κάθε κύτταρο εκφράζονται οι υποδοχείς CD31, CD144, αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) τύπου 1 και 2 υποδοχείς, Tie-2, παράγοντα von Willebrand (vWF), ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικού οξειδίου, και CD146, αλλά και οι δείκτες επιφανείας CD14/CD45 ήταν αισθητά μειωμένοι. Υπό αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας, τα MOMCs συνέχισαν να πολλαπλασιάζονται για 7 ημέρες.

Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων της vWF απελευθέρωσης ύστερα από διέγερση ισταμίνης και αύξηση της έκφρασης του VEGF και VEGF τύπου 1 υποδοχέα σε απάντηση στην υποξία, ήταν δυσδιάκριτα μεταξύ των MOMCs προερχόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων και της καλλιέργειας ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα MOMCs απάντησαν σε αγγειογενετικά ερεθίσματα και προώθησαν τη δημιουργία ώριμων σωληναρίων από ενδοθηλιακά κύτταρα σε Matrigel καλλιέργειες. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι τα ανθρώπινα MOMCs μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται κατά την ενδοθηλιακή σειρά, όταν βρεθούν σε συγκεκριμένο περιβάλλον που τους το επιτρέπει αυτό. Συνεπώς, αποτελούν μια αυτόλογη πηγή κυττάρων που μπορούν να μεταμοσχευθούν για θεραπευτική νεοαγγειογένεση. (74)

Τα MOMCs μπορούν να πολλαπλασιαστούν in vitro και να πάρουν φαινότυπο μακροφάγου, λεμφοκυττάρου, επιθηλιακού κυττάρου, νευρικού κυττάρου και ηπατοκυττάρου, χάρη στην επίδραση συγκεκριμένων διαφοροποιητικών παραγόντων. Αυτό αποκλείει και τη σύντηξή τους με προϋπάρχοντα διαφοροποιημένα κύτταρα των ιστών. Η ευκολία να πάρουμε τα μονοκύτταρα από το περιφερικό αίμα και η δυνατότητα να τα αποθηκεύσουμε σε υγρό άζωτο, τα κάνει αξιόλογους υποψήφιους για αυτόλογη μεταμόσχευση. Πρόσφατες έρευνες αξιοποίησαν τη δυναμικότητα των μεγάλων μονοπυρήνων και έδειξαν ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που έχουν γονιδιακή και μορφολογική ομοιότητα με επιθηλιακά,

νευρικά, ενδοθηλιακά, β κύτταρα και ηπατοκύτταρα. Αυτό φανερώνει ότι το γονιδίωμα των Μεγάλων Μονοκυττάρων έχει μεγάλη πλαστικότητα. (75)

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και από δεύτερη μελέτη, που καταλήγει ότι αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός έχει προγονικά κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διακριτούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του οστίτη ιστού, του χόνδρινου, του λιπώδους, του σκελετικού και του νευρικού. Αυτά τα κύτταρα δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς δείκτες ούτε τον δείκτη επιφανείας των βλαστικών και ενδοθηλιακών κυττάρων CD 34. (73, 76)



Εικόνα 3. Πιθανά μονοπάτια διαφοροποίησης των κυττάρων MOMCs. Τροποποιημένο από Noriyuki Seta et al, 2007. (77)

P. Προγραμματιζόμενα Κύτταρα Μονοκυτταρικής Προέλευσης [Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMO)]

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι τα CD14+ μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούν να μη διαφοροποιηθούν προς δενδριτικά ή μακροφάγα κύτταρα, με τη χρήση συνδυασμού του Παράγοντα Σχηματισμού Αποικιών των Μακροφάγων (M-CSF) και της Ιντερλευκίνης-3 (IL-3), σε 6 ημέρες in vitro καλλιέργειας. (78)

Ο παράγοντας σχηματισμού αποικιών των μακροφάγων (M-CSF) προωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Η ιντερλευκίνη-3 (IL-3) επιδρά στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων και στην αυτο-ανανέωση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Η απάντηση στον συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων είναι η μερική αποδιαφοροποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, με την έννοια ότι επανακτάται η κυτταρική διαίρεση και επαναρυθμίζεται το γενετικό τους υλικό, μειώνονται οι παράγοντες που χαρακτηρίζουν την τελική διαφοροποίηση, ενώ διατηρούνται άλλοι δείκτες της μυελομονοκυτταρικής σειράς. (79)

Τα Προγραμματιζόμενα Κύτταρα Μονοκυτταρικής Προέλευσης [Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMO)] είναι πολυδύναμα κύτταρα των ενηλίκων που προέρχονται από τα Μεγάλα Μονοπύρηνα. Τα Μεγάλα Μονοπύρηνα μπορούν να εξαχθούν από το περιφερικό αίμα και έχουν δυνατότητα διαφοροποίησης σε πολλές κυτταρικές σειρές, συγκρίσιμες με των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων. Η πλαστικότητα των Μεγάλων Μονοπυρήνων εξαρτάται από τη μερική αποδιαφοροποίησή τους για 6 ημέρες σε καλλιέργεια in vitro που περιέχει M-CSF και IL-3. Έπειτα από την αποδιαφοροποίησή τους έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν προς νευρικά, παγκρεατικά, ηπατικά και λιπώδη κύτταρα. (80)

Αξιολογήθηκε η ικανότητα των PCMO να διορθώσουν την υπεργλυκαιμία σε ένα καθιερωμένο μοντέλο διαβητικού ποντικού. Μετά την εμφύτευση των ανθρώπινων PCMO-παραγόμενων κυττάρων, η υπεργλυκαιμία διορθώθηκε μέσα σε 2 ημέρες στους παραλήπτες, αλλά όχι στα ζώα-μάρτυρες. Τα ζώα που έλαβαν τις μεταμοσχεύσεις παρέμειναν νορμογλυκαιμικά για 8 ημέρες μετά από τη μεταμόσχευση. Μέχρι αυτόν τον χρόνο, τα κύτταρα παρέμειναν βιώσιμα και θετικά στην παραγωγή ινσουλίνης, όπως παρουσιάζονται από ανοσοϊστοχημεία των τμημάτων ιστού της κάψας νεφρών. Η απουσία υπογλυκαιμικών επεισοδίων δείχνει ότι η ρύθμιση της γλυκόζης αίματος οφειλόταν σε μια γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης και όχι στην παθητική απελευθέρωση ινσουλίνης από τα νεκρά κύτταρα. Επειδή η κυτταρική απόρριψη εμφανίστηκε 8 έως 10 ημέρες μετά από τη μεταμόσχευση, οι δοκιμασίες ανοχής γλυκόζης δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν σε αυτά τα ζώα.

Η απόρριψη των κυτταρικών μοσχευμάτων ήταν εμφανής από τη διείσδυση λεμφοκυττάρων στον ιστό. Ταυτόχρονα απέτυχαν τα κύτταρα να ομαλοποιήσουν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος πέρα από την ημέρα 9. Περαιτέρω πειράματα, που περιλαμβάνουν είτε την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είτε τη χρήση ανοσο-ανεπαρκών ποντικών, απαιτούνται για να μελετήσουν εάν η μακροπρόθεσμη λειτουργία αυτών των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί. Στις πιθανές μελλοντικές κλινικές εφαρμογές, συγκαταλέγεται η *in vitro* δημιουργία PCMO νεοηπατοκυττάρων και ινσουλινοπαραγωγών κυττάρων και στη συνέχεια η αυτόλογη μεταμόσχευση στους ασθενείς. Τα PCMO κύτταρα πιθανότατα θα μπορέσουν να αντικαταστήσουν τις βλάβες των αντίστοιχων ιστών.

Η προσβασιμότητα και η δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού των Προγραμματιζόμενων Κυττάρων Μονοκυτταρικής Προέλευσης θα μπορούσε να κάνει τα κύτταρα αυτά κατεξοχήν κατάλληλα για θεραπεία του διαβήτη με τη μεταμόσχευση αυτόλογων κυττάρων για την αναπλήρωση των κατεστραμμένων νησιδίων. (79)

Πρόσφατα ανακοινώθηκε πειραματική μελέτη που διερεύνησε αν τα προγραμματιζόμενα κύτταρα μονοκυτταρικής προέλευσης (PCMO) μπορούν να επιτύχουν την αποκατάσταση της αριστερής κοιλίας της καρδιάς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI). Τα PCMO παρήχθησαν από τα μονοκύτταρα σε καλλιέργεια που περιέχει RPMI, M-CSF και IL-3 για 6 ημέρες. Έμφραγμα μυοκαρδίου προκλήθηκε σε θηλυκούς αρουραίους Lewis απολινώνοντας την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Τα PCMO των αρρένων δοτών Lewis αρουραίων ενέθηκαν είτε ενδομυοκαρδιακά (*i.m.y.*) ή ενδοφλεβίως (*i.v.*) 24 ώρες ή 6 ημέρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Η αιμοδυναμική εκτίμηση που πραγματοποιήθηκε μετά από 60 ημέρες απέδειξε σημαντική βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας μετά *i.m.y.* μεταμόσχευση PCMO καθώς και έγκαιρη (24 ώρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου) *i.v.* εφαρμογή, ενώ τα μη τροποποιημένα μονοκύτταρα απέτυχαν να αποκαταστήσουν την καρδιακή λειτουργία. Το γονίδιο SR γ , που βρίσκεται αποκλειστικά στο Y χρωμόσωμα των αρσενικών PCMO κυττάρων των δοτών, εντοπίστηκε αποκλειστικά σε καρδιές ζώων με έμφραγμα που βελτιώθηκε σημαντικά η λειτουργία τους σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιτυχής καλλιέργεια PCMO σε μεγάλους αριθμούς επιτρέπει την αυτόλογη χρήση τους ως μιας νέας πρόσθετης θεραπείας για την έγκαιρη αποκατάσταση της καρδιακής λειτουργίας μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου. (81)

Τα μεγάλα μονοπύρηνια μπορούν να μετατραπούν σε χονδροκύτταρα, τα οποία συνεχώς παράγουν κολλαγόνο τύπου II. Τα PCMOs διαφοροποιήθηκαν σε χονδροκύτταρα που παρήγαν συνεχώς τον τύπο II κολλαγόνου κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου καλλιέργειας 6 εβδομάδων ακόμη και σε ένα δισδιάστατο σύστημα καλλιέργειας. Η

ανοσοϊστοχημική χρώση αποκάλυψε μια ισχυρή συσσώρευση του τύπου II κολλαγόνων μετά από επώαση με BMP-2, BMP-7, TGF-β, IGF-I, ή με TGF-β, και IGF-I για 6 εβδομάδες. Η παραγωγή του τύπου I κολλαγόνου σε PCMOs μετά από μία εβδομάδα μπορεί να υποδηλώνει μια πιθανή διαφοροποίηση και σε οστεοβλάστες. Οι πιθανές εφαρμογές εντοπίζονται στην επιδιόρθωση του χόνδρου των αρθρώσεων σε περίπτωση κακώσεων ή οστεοαρθρίτιδας. (80)

VI. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Q. T Λεμφοκύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την κυτταρική ανοσία και σχετίζονται με την ενίσχυση ή την αναστολή της ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων. Επίσης τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα σχετίζονται με την προστασία από ενδοκυττάρια παθογόνα (ιούς, βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα). Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη χρόνια απόρριψη στις μεταμοσχεύσεις οργάνων.

R. B Λεμφοκύτταρα

Τα B λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη χυμική ανοσία και την παραγωγή αντισωμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται μετά τη μετατροπή τους σε πλασματοκύτταρα, τα οποία έχουν την ιδιότητα σύνθεσης και έκκρισης ανοσοσφαιρινών. Η μετατροπή των B λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα είναι σύνθετη διεργασία, στην οποία συμμετέχουν τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα. Οι ανοσοσφαιρίνες παρέχουν προστασία από εξωκυττάρια παθογόνα. Επίσης, η υπεροξεία απόρριψη μοσχευμάτων σχετίζεται με τα B λεμφοκύτταρα.

S. Λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς (NK Λεμφοκύτταρα)

Τα NK λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα του αίματος και συμβάλλουν στη μη ειδική ανοσία. Τα NK λεμφοκύτταρα είναι περισσότερα από τα B λεμφοκύτταρα σε αναλογία 3:1. Ο πληθυσμός των NK λεμφοκυττάρων είναι ετερογενής, τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά. Μπορεί να διακριθεί σε δύο ομάδες με τον δείκτη επιφανείας CD56. Η μία ομάδα λεμφοκυττάρων εκφράζει έντονα το CD56 και η άλλη ομάδα καθόλου. Παράγουν την κυτταροκίνη Ιντερφερόνη-γ που βοηθά την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από ιό ή έχουν κακοήγη εξαλλαγή.

T. Προέλευση και ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων

Τα λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα στάδια ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων είναι: λεμφοβλάστη, προλεμφοκύτταρο και το ώριμο λεμφοκύτταρο. Η

εξέλιξή τους γίνεται πρωτογενώς στον μυελό των οστών και στον θύμο και στη συνέχεια στα λεμφογάγγλια, σπλήνα και λεμφικό ιστό του εντέρου. Κατά την πρωτογενή τους εξέλιξη μετατρέπονται σε Τ ή Β λεμφοκύτταρα.

Τα λεμφοκύτταρα μετακινούνται ελεύθερα μεταξύ της αιματικής κυκλοφορίας και των ιστών. Η μετακίνηση αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταβίβαση της ανοσιακής πληροφορίας. Τα λεμφοκύτταρα έρχονται σε επαφή με τα επεξεργασμένα αντιγόνα των ιστών και ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση σε αυτά.

Κάθε στιγμή, το 5% των λεμφοκυττάρων είναι παρόν στην αιματική κυκλοφορία, όπου το 60%-80% είναι Τ λεμφοκύτταρα και το 20% είναι Β. Συνολικά στον ενήλικα, περίπου το 34% των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος αποτελείται από λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, στα βρέφη το μεγαλύτερο ποσοστό λευκών αιμοσφαιρίων αποτελείται από λεμφοκύτταρα, κυρίως Τ τύπου.

Τα πλασματοκύτταρα απουσιάζουν φυσιολογικά από το περιφερικό αίμα. Η εύρεσή τους εκεί συνδέεται με σοβαρές χρόνιες λοιμώξεις ή με πολλαπλό μυέλωμα. Τα ώριμα Τ λεμφοκύτταρα επιβιώνουν για μερικούς μήνες ή έτη, ενώ η μέση επιβίωση των Β λεμφοκυττάρων ανέρχεται σε μερικές ημέρες. (82)

U. Μορφολογία των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα

Τα λεμφοκύτταρα που συναντώνται στο περιφερικό αίμα είναι κατά κανόνα μικρά κύτταρα με 6-9 μm διάμετρο και ελλειπτικό ή στρογγυλό πυρήνα. Η χρωματίνη τους είναι πυκνή και αδρά διαταγμένη. Οι πυρηνίσκοι φαίνονται σπάνια. Το κυτταρόπλασμα περιβάλλει στενά τον πυρήνα και είναι ελαφρώς βασεόφιλο. Τα λεμφοκύτταρα με μεγαλύτερο μέγεθος και κοκκίωση είναι κυρίως Natural Killer τύπου. (83)

VII. INKRETINES

Στις αρχές του 20ού αιώνα γεννήθηκε η ιδέα ότι παράγοντες του εντέρου επηρεάζουν την ενδοκρινική έκκριση. Ο όρος εκκριματίνη (ή σεκρετίνη) πρωτοχρησιμοποιήθηκε για να ορίσει παράγοντες που ρυθμίζουν την έκκριση του παγκρέατος. Το 1920 εισήχθη και ο όρος ινκρετίνη για να περιγράψει νέους παράγοντες που ενισχύουν την παγκρεατική έκκριση. Η εκκριματίνη και οι ινκρετίνες εκκρίνονται από τα κοκκιώδη κύτταρα του βλεννογόνου του δωδεκαδακτύλου και του λεπτού εντέρου. Αυτό όμως δεν ήταν γνωστό κατά την ανακάλυψή τους.

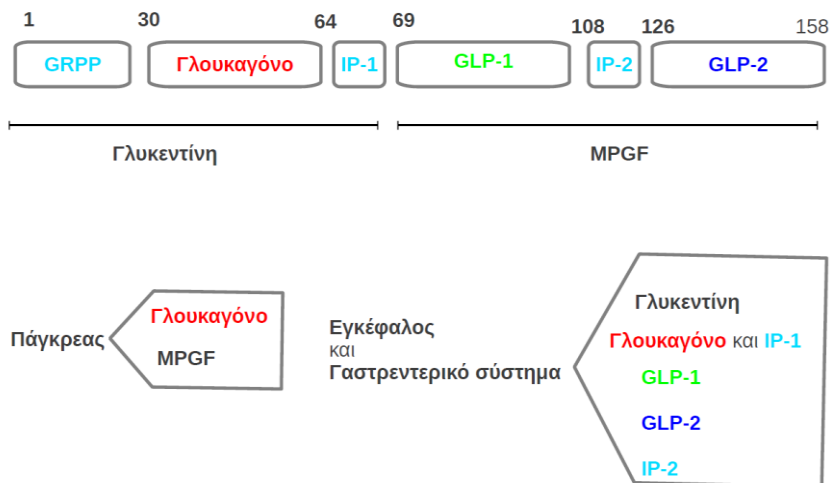
V. Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1

Κωδικοποιείται το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1 [Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)] στο γονίδιο του προ-Γλουκαγόνου στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 2 (Εικόνα 4). Το γονίδιο του προ-Γλουκαγόνου κωδικοποιεί το Γλουκαγόνο, το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1 (GLP-1) και το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-2 (GLP-2) και άλλα πεπτίδια που προέρχονται από αυτό. (84)

Το γλουκαγόνο είναι το κύριο προϊόν της επεξεργασίας του προ-γλουκαγόνου στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Το GLP-1 παράγεται μαζί με το GLP-2 και το γλουκαγόνο του εντέρου στα εντεροενδοκρινή L κύτταρα. Στο πάγκρεας από τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του προγλουκαγόνου παράγεται κυρίως γλουκαγόνο, ενώ στα εντεροενδοκρινή L κύτταρα παράγεται GLP-1, GLP-2 και γλυκεντίνη (εντερογλουκαγόνο). Παρ' όλο που έχουν μεγάλη ομολογία, τα πεπτίδια GLP-1 και GLP-2 δεν έχουν την ίδια δράση. Το GLP-2 είναι ρυθμιστής της ανάπτυξης των κυττάρων του εντερικού σωλήνα. (85) Οι δράσεις του GLP-1 συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οι δράσεις του GLP-1 στον ανθρώπινο οργανισμό. Τροποποιημένο από Gautier JF et al, 2005. (86)

Δράσεις του GLP-1 στον ανθρώπινο οργανισμό	
Υποθάλαμος	Μείωση της όρεξης και της πρόσληψης τροφής
Στόμαχος	Μείωση της κινητικότητας και αύξηση του αισθήματος του κορεσμού
α κύτταρα παγκρέατος	Μείωση της έκκρισης γλουκαγόνου
β κύτταρα παγκρέατος	Αύξηση της σύνθεσης και έκκρισης ινσουλίνης
	Νεογένεση των β κυττάρων
Ήπαρ	Μείωση της απελευθέρωσης γλυκόζης
Λιπώδη κύτταρα	Αύξηση της λιπογένεσης



Εικόνα 4. Η δομή του προ-γλουκαγόνου των θηλαστικών και τα πεπτίδια που προέρχονται από αυτό. **GRPP**: Glicentin Related Pancreatic Polypeptide – Παγκρεατικό Πολυπεπτίδιο που σχετίζεται με τη Γλυκεντίνη, **IP-1**: Interferon gamma inducible Protein-1 – Πρωτεΐνη 1 που εκφράζεται από την επίδραση της ιντερφερόνης γ, **GLP-1**: Glucagon-like Peptide-1 – Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο πεπτίδιο-1, **IP-2**: Interferon gamma inducible Protein-2 – Πρωτεΐνη 2 που εκφράζεται από την επίδραση της ιντερφερόνης γ, **GLP-2**: Glucagon-like Peptide-2 – Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο πεπτίδιο-2, **MPGF**: Major Pro-glucagon Fragment – Κυρίως τμήμα του Προ-γλουκαγόνου.

W. Ινσουλινότροπα ερεθίσματα

Η απελευθέρωση της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια των γευμάτων εξαρτάται:

1. Από την άμεση δράση των θρεπτικών συστατικών.
2. Από τα πεπτίδια-ορμόνες που απελευθερώνονται από το έντερο. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των β κυττάρων είναι η ευαισθησία σε αυτές τις ορμόνες. Στον άνθρωπο δύο γαστρεντερικές πεπτιδικές ορμόνες είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο της ινκρετίνης. Είναι το Γλυκοζο-εξαρτώμενο Ινσουλινο-εκκριτικό Πολυπεπτίδιο [glucose-dependent insulin releasing polypeptide (GIP)] και το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1 [glucagon-like peptide-1(GLP-1)]. Και τα δύο πεπτίδια εκκρίνονται σε απάντηση της πέψης της τροφής και ενισχύουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης από τη γλυκόζη.

3. Από το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα, το οποίο προκαλεί την κεφαλική φάση της έκκρισης ινσουλίνης. Έτσι, καθίστανται οι χολινεργικοί υποδοχείς των β κυττάρων μέρος του μηχανισμού που επιτρέπει την εξαιρετικά συντονισμένη έκκριση.

X. Το φαινόμενο της ινκρετίνης

Η σύνδεση μεταξύ του γαστρεντερικού συστήματος και της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος διαπιστώθηκε το 1960, όταν η ινσουλίνη μπορούσε να μετρηθεί στο πλάσμα. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι για την ίδια αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα, εκκρίνεται περισσότερη ινσουλίνη αν η χορήγηση γλυκόζης γίνει από τον πεπτικό σωλήνα, σε σύγκριση με την ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η γλυκόζη αλληλεπιδρά όχι μόνο με τα β κύτταρα του παγκρέατος αλλά και με εντερικά κύτταρα που διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης. (87)

Y. Μείωση του φαινομένου της ινκρετίνης στον σακχαρώδη διαβήτη

Οι δύο ορμόνες που συνιστούν τις ινκρετίνες, Εξαρτώμενο από Γλυκόζη Ινσουλινότροπο Πολυπεπτίδιο (GIP) και Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεππίδιο-1 (GLP-1), είναι υπεύθυνες για το 50%-70% της μεταγευματικής έκκρισης ινσουλίνης σε υγιείς ενήλικες. Όμως η συμβολή τους στη συνολική έκκριση ινσουλίνης σε διαβητικούς τύπου 2 είναι κάτω από 20%. Οι αιτίες αυτής της διαφοράς δεν έχουν διευκρινιστεί. (88)

Η μείωση της έκκρισης του GLP-1 στους διαβητικούς τύπου 2 γίνεται 2-3 ώρες μετά το γεύμα, ενώ τα επίπεδα του GLP-1 δεν μεταβάλλονται ιδιαίτερα στην άμεση μεταγευματική περίοδο. Έτσι, τα μειωμένα επίπεδα GLP-1 δεν είναι υπεύθυνα για τη μειωμένη μεταγευματική έκκριση ινσουλίνης. (89, 90)

Η συγκέντρωση του GLP-1 έχει μεγάλη διακύμανση στους ανθρώπους, τόσο ανάμεσα στους διαβητικούς όσο ανάμεσα και στους υγιείς. Ακόμη και στην ομάδα των διαβητικών η μέση τιμή της συγκέντρωσης GLP-1 είναι κοντά στα φυσιολογικά όρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν είναι υπεύθυνη η μειωμένη συγκέντρωση του GLP-1 για την εμφάνιση διαβήτη. (91)

Η υπεργλυκαιμία στους διαβητικούς τύπου 2 μπορεί να διακοπεί με τη χορήγηση ενδοφλεβίως GLP-1, ακόμη και σε μικρές δόσεις. (92)

Επομένως, δεν φαίνεται να υπάρχει εμπόδιο στη δράση του GLP-1 στους διαβητικούς τύπου 2. Πιθανότατα, η μειωμένη έκκριση ινσουλίνης οφείλεται στη γενικότερη μειωμένη λειτουργικότητα των β κυττάρων του παγκρέατος. (93)

Αντίθετα, η χορήγηση του GIP σε διαβητικούς τύπου 2 προκάλεσε την έκκριση μόνο 46% της απαιτούμενης ποσότητας ινσουλίνης. (94)

Αυτή η μειωμένη απάντηση των β κυττάρων στο GIP οφείλεται στις απώτερες τροφικές επιδράσεις που έχει το GIP στα β κύτταρα και όχι σε σημαντική άμεση επίδραση στη λειτουργικότητά τους. Παράλληλα, το GIP διεγείρει την έκκριση γλουκαγόνου, που είναι ανταγωνιστική ορμόνη της ινσουλίνης. (95)

Έξι πιθανοί παράγοντες συντελούν στη μείωση του φαινομένου της ινκρετίνης:

(α) Μειωμένη εκκριτική ικανότητα των β κυττάρων

Η μείωση του φαινομένου της ινκρετίνης στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ίσως να αντανακλά περισσότερο τη μειωμένη εκκριτική ικανότητα των β κυττάρων, παρά την ύπαρξη προβλήματος στη δράση ή έκκριση των ινκρετινών. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία είναι η παρατήρηση ότι το φαινόμενο της ινκρετίνης είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη γλυκόζη νηστείας. (13)

Άρα οι υγιείς με χαμηλότερη γλυκόζη νηστείας έχουν εντονότερο φαινόμενο ινκρετίνης, ενώ οι διαβητικοί με υψηλή γλυκόζη νηστείας το έχουν μειωμένο. Επίσης παρόμοια ελάττωση του φαινομένου βρίσκεται σε όλους τους τύπους του σακχαρώδους διαβήτη.

(β) Μειωμένη έκκριση ινκρετινών

Η καθυστερημένη έκκριση του GLP-1 πραγματοποιείται 2-4 ώρες μετά τα γεύματα και δεν συμπίπτει με την έκκριση ινσουλίνης που πραγματοποιείται 30-60 λεπτά μετά το γεύμα. (96)

Οι συγκεντρώσεις GLP-1 και GIP είναι σημαντικά μειωμένες σε καταστάσεις μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, σε σύγκριση με τα επίπεδα που υπάρχουν σε καταστάσεις καλής γλυκαιμικής ρύθμισης. Πιθανότατα, η υπεργλυκαιμία αναστέλλει τη γαστρική κένωση και αλυσιδωτά αναστέλλεται και η έκκριση των ινκρετινών. (97)

Άρα, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης θα μπορούσε να βελτιώσει αυτή την κατάσταση. Όμως αυτό δεν επιβεβαιώθηκε. Η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος δεν σχετίζεται σημαντικά με την έκκριση του GLP-1. (96)

(γ) Απώλεια της δράσης του GIP

Θα μπορούσε να οφείλεται στη μειωμένη ευαισθησία των β κυττάρων στη GIP διέγερση. Παράλληλα, τα β κύτταρα έχουν μειωμένη ευαισθησία και στα υπόλοιπα εκκριταγωγά της ινσουλίνης και κυρίως στη γλυκόζη. Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 εκκρίνουν 85% λιγότερη

ινσουλίνη σε σχέση με τους μάρτυρες, έπειτα από bolus ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης.

Το μέγεθος της μειωμένης ευαισθησίας στην έκκριση ινσουλίνης είναι αντίστοιχο για το GIP. (98) Αυτό ενισχύει την ιδέα ότι η παρεμπόδιση της δράσης του GIP διέρχεται από την ίδια μεταβολική οδό με την παρεμπόδιση της δράσης της γλυκόζης στα β κύτταρα.

(δ) Η υπεργλυκαιμία

Η υπεργλυκαιμία θεωρείται παράγοντας παρεμπόδισης του φαινομένου της ινκρετίνης. Η αυστηρότερη ρύθμιση του σακχάρου αίματος θα προκαλούσε αύξηση του φαινομένου της ινκρετίνης; Μία ομάδα διαβητικών με φτωχή ρύθμιση σακχάρου αίματος ($HbA1c=8,6 \pm 1,3$) τέθηκε σε αυστηρή παρακολούθηση και ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης για έναν μήνα. Διαπιστώθηκε στο τέλος του μήνα σημαντική αύξηση των ινσουλινοτρόπων δράσεων του GLP-1 και GIP, μόνο όμως στη μεταγευματική περίοδο. (99)

Πιθανόν, η «ξεκούραση» των β κυττάρων με την εντατική ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης από την εξωγενή χορήγηση ενέσιμης ινσουλίνης, αύξησε την ευαισθησία των κυττάρων στα ινσουλινοτρόπα ερεθίσματα.

(ε) Μειωμένη ευαισθησία στις ινκρετίνες λόγω κληρονομικότητας

Η χορήγηση των αγωνιστών του GLP-1, εξενατίδη και λιραγλουτίδη, είχε ευνοϊκή επίδραση στη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη μόνο στο 70% των ασθενών. Στο υπόλοιπο 30% η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη παρέμεινε αμετάβλητη. Δύο αιτίες φαίνεται να συντελούν σε αυτό: Πρώτον, η διάρκεια του διαβήτη. Όσο μεγαλύτερη η διάρκεια, τόσο μικρότερη η ωφέλεια από τις θεραπείες. Δεύτερον, η κληρονομικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων ενηλίκων στους αγωνιστές του GLP-1. (100)

Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται σε καταστάσεις διαβήτη, αλλά και προ-διαβήτη, με την ύπαρξη διαταραχής στην ανοχή της γλυκόζης. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια, το TCF7L2 και το WFS1, ορισμένα αλληλόμορφα των οποίων προσδίδουν μειωμένη ευαισθησία στην GLP-1 εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης. (101, 102) Υπολογίζεται ότι το ένα τρίτο του πληθυσμού είναι φορέας αλληλόμορφου γονιδίου αντίστασης στο GLP-1. Στο μέλλον θα είναι χρήσιμος ο προσδιορισμός των παραπάνω γονιδίων για να καθοριστεί η θεραπεία του διαβήτη. Έχει φανεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η υπεργλυκαιμία, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αντίσταση που προκαλούν τα παραπάνω γονίδια στο GLP-1. (100)

στ) Επιβαρυντικός τρόπος ζωής

Επίσης, η δίαιτα με υψηλές θερμίδες, η καθιστική ζωή και η χρήση στεροειδών για πάνω από 14 ημέρες μειώνουν την ευαισθησία του

οργανισμού στην ινσουλίνη. Ταυτόχρονα μειώνουν και το φαινόμενο της ινκρετίνης, ενώ η έκκριση των ινκρετινών διατηρείται σταθερή. Άρα, θεωρείται ότι μειώνεται η ευαισθησία του οργανισμού και στις ινκρετίνες. (103)

Το συνολικό θεωρητικό μοντέλο που συνδέει τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι το εξής:

1. Επιβαρυντικός τρόπος ζωής.
2. Κληρονομική μειωμένη ευαισθησία στις ινκρετίνες.
3. Επιβάρυνση των β κυττάρων και υπερλειτουργία τους.
4. Η μείωση της μάζας των β κυττάρων οδηγεί σε σοβαρή μείωση της μέγιστης παραγόμενης και εκκρινόμενης ποσότητας ινσουλίνης.
5. Η χρόνια υπεργλυκαιμία αναστέλλει την έκκριση του GLP-1 και τις δράσεις του GIP μειώνοντας τους υποδοχείς του.
6. Απώλεια των τροφικών ερεθισμάτων με αποτέλεσμα την επιπλέον μείωση της μάζας των β κυττάρων.

Z. Επιδράσεις του GLP-1 στη βιοσύνθεση και έκκριση ινσουλίνης

Σε απομονωμένα β κύτταρα καλλιέργειας το GLP-1 φαίνεται ότι αυξάνει τον ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της ινσουλίνης και τη μετάφρασή του σε πρωτεΐνη, ώστε να υπάρχουν διαρκώς αποθηκευμένα κυστίδια ινσουλίνης για έκκριση. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι σημαντικό για τη διατήρηση σταθερών επιπέδων ινσουλίνης στον οργανισμό. (104)

Το GLP-1 ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από τα επίπεδα γλυκόζης αίματος έκκριση ινσουλίνης, από τα κύτταρα του Langerhans, in vivo σε ζώα και στον άνθρωπο. Στους ποντικούς μειώθηκε η έκκριση ινσουλίνης σε απάντηση της λήψης τροφής όταν χρησιμοποιήθηκαν ανταγωνιστές του GLP-1 υποδοχέα. Επίσης, τα GLP-1 knockout ποντίκια είχαν υπεργλυκαιμία νηστείας, παθολογικές καμπύλες γλυκόζης και μειωμένη έκκριση ινσουλίνης μετά από γεύμα. Στους ανθρώπους η δράση του GLP-1 είναι αυστηρά εξαρτώμενη από τα επίπεδα γλυκόζης αίματος. Αν η συγκέντρωση γλυκόζης πέσει κάτω από 4,5 mmol/lit (80 mg/dl), τότε δεν έχει καμία επίδραση το GLP-1 στην έκκριση ινσουλίνης. Το GLP-1 διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος, τόσο in vitro όσο και in vivo. Η διέγερση αυτή επιτυγχάνεται τόσο σε επίπεδο γονιδιακής μεταγραφής, όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης. (87, 105)

AA. Μηχανισμός δράσης του GLP-1 στη ρύθμιση της μάζας των β κυττάρων

Συνοπτικά η ρύθμιση της μάζας των β κυττάρων επιτυγχάνεται δυνητικά με τρεις τρόπους:

1. Ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των β κυττάρων.
2. Αναστολή της απόπτωσης των β κυττάρων.
3. Διαφοροποίηση των πιθανών βλαστικών κυττάρων του επιθηλίου των πόρων σε κύτταρα νησιδίων.

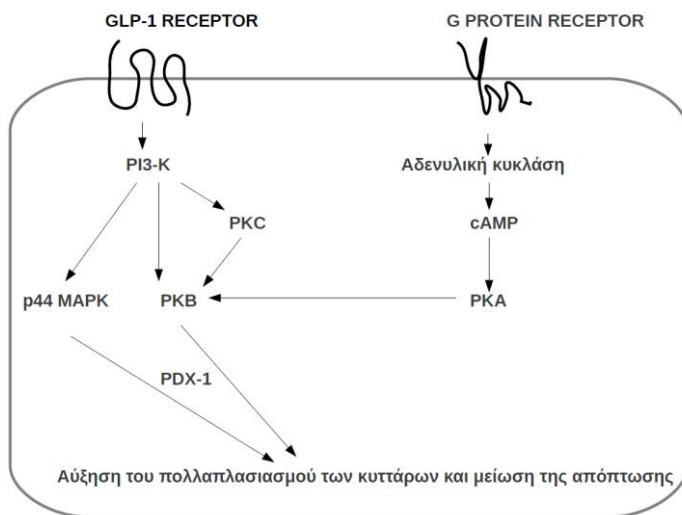
Φαίνεται ότι το GLP-1 έχει τροφική επίδραση στη μάζα των β κυττάρων του παγκρέατος *in vivo*. Όταν χορηγήθηκε σε διαβητικά τρωκτικά, αυξήθηκε η μάζα των β κυττάρων. Βρέθηκε ότι προωθεί τη σύνθεση του DNA τους, τη διαφοροποίηση των προγονικών μορφών τους και προάγει τις αντι-αποπτωτικές δράσεις τους. Τα ίδια ευρήματα επαληθεύτηκαν και σε καλλιέργειες ανθρώπινων β κυττάρων *in vitro*. (106, 107)

Ο μεταγραφικός παράγοντας Παγκρεατική και Δωδεκαδακτυλική Ομοιοακολουθία-1 [Pancreatic and Duodenal Homeobox-1 (PDX-1)] αύξησε τη δραστηριότητά του με την παρουσία GLP-1 σε συγκέντρωση γλυκόζης μεταξύ 3 και 11 mmol/lit (54-200 mg/dl). Αυξήθηκε η έκφραση του υποδοχέα GLUT 2, της γλυκοκινάσης και της ινσουλίνης. Επίσης αυξήθηκε η ενσωμάτωση της σημασμένης θυμιδίνης σε μεμονωμένα νησιδία ποντικών, πράγμα που σημαίνει πως αυξήθηκε το γενετικό τους υλικό, άρα ο πολλαπλασιασμός τους. Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ως αυξητικός παράγοντας που σχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης και του μεταβολισμού της γλυκόζης. (108)

Οι δράσεις του GLP-1 προκαλούνται από τη σύνδεση με τον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης GLP-1 receptor (GLP-1R). Ο υποδοχέας αποτελείται από 436 αμινοξέα και είναι συνδεδεμένος με μία G πρωτεΐνη. Εκφράζεται στα β κύτταρα των νησιδίων και η ενεργοποίησή του οδηγεί στη συσσώρευση του ενδοκυττάριου κυκλικού AMP (cAMP). Στη συνέχεια επάγονται οι δράσεις που εξαρτώνται από την Πρωτεϊνική Κινάση A, αλλά και δράσεις που δεν εξαρτώνται από αυτή. (109)

Ενισχύει τη διαφοροποίηση των ενδοκρινών κυττάρων και την αύξηση της μάζας τους. Τα AR42J κύτταρα αποτελούν όγκο του επιθηλίου των πόρων του παγκρέατος των ποντικών. Έκθεση των κυττάρων AR42J του αρουραίου στο GLP-1 για 24 με 48 ώρες οδηγεί αρχικά σε αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων cAMP και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στη συνέχεια σταματά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και εκφράζονται οι νησιδιακές ορμόνες ινσουλίνη, γλουκαγόνο και σωματοστατίνη σε ποσοστό άνω του 50% των κυττάρων. (87)

Το GLP-1 ασκεί τη δράση του μέσω επταμερών διαμεμβρανικών υποδοχέων, που βρίσκονται συζευγμένοι με G πρωτεΐνη και συνδέονται με την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A. Επιπλέον, σημαντικές ενδείξεις υποστηρίζουν τη σύνδεση του GLP-1 υποδοχέα σε πολλαπλές πρωτεΐνες G. Αναλύσεις παγκρεατικού ιστού από τρωκτικά που έλαβαν για βραχύ διάστημα ή χρονίως GLP-1R αγωνιστές δείχνουν αύξηση του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων β κυττάρων. Ομοίως, η θεραπεία των β κυτταρικών σειρών με GLP-1 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό *in vitro*. Οι επιδράσεις του GLP-1 και GIP στον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων του παγκρέατος επηρεάζουν πολλά σηματοδοτικά μόρια (Εικόνα 2), συμπεριλαμβανομένων της Κινάσης της Φωσφατιδυλινοσιτόλης-3, της Πρωτεϊνικής Κινάσης Βήτα (Akt), της Κινάσης που ενεργοποιείται από τα Μιτογόνα (MAPK) και της Πρωτεΐνης Κινάσης C. Η σημασία των συγκεκριμένων μορίων σηματοδότησης ως μεσολαβητών του πολλαπλασιασμού έχει αναδειχθεί και σε μοριακό επίπεδο με τη χρήση συμπληρωματικών DNA (cDNAs). Πιο πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την src Κινάση, τον υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR) και το υπόστρωμα-2 του υποδοχέα της ινσουλίνης ως πρόσθετους καθοριστικούς παράγοντες της GLP-1 δράσης στα β κύτταρα. (108)



Εικόνα 5. Το GLP-1 προωθεί την επέκταση της μάζας των β κυττάρων με άμεση ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των β κυττάρων και της απόπτωσης. Οι οδοί μετάδοσης του σήματος αντιπροσωπεύουν ένα διάγραμμα των δράσεων του GLP-1 που καταρτίστηκε από τις μελέτες σε τρωκτικά, σε ανθρώπινα νησιδικά κύτταρα και σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές. **PDX-1**: Παγκρεατική Δωδεκαδακτυλική Ομοιοακολουθία-1, **PI3-K**: 3-Κινάση

Της Φωσφατιδινουσιτόλης, **Pka**: Πρωτεϊνική Κινάση A, **Pkβ**: Πρωτεϊνική Κινάση B, **Pkc**: Πρωτεϊνική Κινάση C, **P44 Mapk**: Πρωτεϊνική Κινάση 44 που ενεργοποιείται με Μιτογόνα, **Camp**: Κυκλικό AMP. Σχήμα τροποποιημένο από Drucker DJ et al, 2003. (108)

VIII. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ GLP-1

BB. Εξενατίδη-4

Η εξενατίδη-4 ανακαλύφθηκε στους σιελογόνους αδένες του ερπετού Gila Monster Lizard. Παρ' όλο που είναι προϊόν γονιδίου ενός ερπετού, έχει 52% κοινή ομολογία αμινοξέων με το GLP-1 των θηλαστικών και συνδέεται με τον GLP-1 υποδοχέα. Η εξενατίδη-4 είναι πιο δραστική από το GLP-1 και γι' αυτό τον λόγο μπορεί να προκαλέσει βιολογικά αποτελέσματα σε δόση ίση με 10^{-11} mol/l. Ταυτόχρονα διεγείρει τη διαφοροποίηση των προγονικών παγκρεατικών κυττάρων των πύρων προς β κύτταρα και τον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων, όταν χορηγείται σε ποντικούς. (110)

Η εξενατίδη, που είναι το συνθετικό μόριο της εξενατίδης-4, είναι επικρατές φάρμακο για ανάπτυξη σε κλινικές δοκιμές των αγωνιστών του GLP-1 υποδοχέα επειδή δρα ως πλήρης αγωνιστής του υποδοχέα GLP-1. Έδειξε ρυθμιστικές δράσεις σε μεγάλο αριθμό προκλινικών δοκιμών: εξαρτώμενη από τη γλυκόζη αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης και μείωση της έκκρισης γλουκαγόνου, μείωση της γαστρικής κένωσης και μείωση της όρεξης. Επιπρόσθετα φάνηκε ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων και τη νεογένεση των νησιδίων από τα προγονικά κύτταρα, τόσο in vitro όσο και in vivo. (111)

Η εξενατίδη-4 παρατηρούμε ότι ενεργοποιεί τις ίδιες μεταβολικές οδούς με το πρωτότυπο μόριο GLP-1. Η σημασία της Παγκρεατικής Δωδεκαδακτυλικής Ομοιοακολουθίας-1 (PDX-1) και του Ηπατοκυτταρικού Πυρηνικού Παράγοντα-3 (HNF-3) για την ενεργοποίηση του υποδοχέα του GLP-1 (GLP-1R) και την επακόλουθη διαφοροποίηση του κυττάρου έχει μελετηθεί στα Caran-1 κύτταρα. Τα Caran-1 κύτταρα προέρχονται από καρκινικά κύτταρα των πύρων του παγκρέατος, τα οποία εκφράζουν τον GLP-1R. Περίπου το 10% των κυττάρων περιέχει ινσουλίνη ή/και γλουκαγόνο. Έπειτα από την επίδραση της εξενατίδης το 40% των κυττάρων περιέχει ινσουλίνη ή/και γλουκαγόνο. Η επίδραση αυτή σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα των MAPK κινασών και με την αυξημένη συσσώρευση κυκλικού AMP (cAMP). Τα παραπάνω επάγουν την έκφραση της γλυκοκινάσης, του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-2, του μεταγραφικού παράγοντα NeuroD, του μεταγραφικού παράγοντα PDX-1 και Ηπατοκυτταρικού Πυρηνικού Παράγοντα-3 (hepatocyte nuclear factor-3). Η εξενατίδη-4 προκάλεσε τη μετακίνηση στον πυρήνα του κυττάρου του PDX-1, η οποία αναστράφηκε με τη συγχορήγηση αναστολέα της Πρωτεϊνικής

Κινάσης A (PKA). (112)

In vivo η εξενατίδη διεγείρει τη διαφοροποίηση των κυττάρων των παγκρεατικών πόρων σε β κύτταρα και τον πολλαπλασιασμό των ήδη υπάρχοντων β κυττάρων. Σε ποντικούς που υποβλήθηκαν σε μερική παγκρεατεκτομή, η χορήγηση της εξενατίδης άμβλυσε την ανάπτυξη του διαβήτη και ξεκίνησε αναγεννητικές διεργασίες. Αναπτύχθηκαν νεόπλαστα αγγεία και πολλαπλασιάστηκαν τα β κύτταρα. Έτσι το GLP-1 και τα ανάλογά του μπορεί να αποτελέσουν μία νέα θεραπευτική επιλογή σε άτομα με ελαττωμένη μάζα των β κυττάρων. (112)

Η χορήγηση της εξενατίδης-4 συνέβαλε στη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη, σε κύτταρα ποντικών in vitro. Έτσι λοιπόν, μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών των ποντικών απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν με τροφικούς παράγοντες και εξενατίδη-4. Στη συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης ποσότητας ινσουλίνης και προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων. Εμφυτεύθηκαν σε διαβητικούς ποντικούς και παρατηρήθηκε ευγλυκαιμία για 8 ημέρες, έως ότου το ανοσοποιητικό σύστημα των ποντικών απέρριψε τα κύτταρα και τα ποντίκια ξαναέγιναν διαβητικά. Διαπιστώθηκε δηλαδή ότι η εξενατίδη-4 έχει τροφική επίδραση στη μάζα των β κυττάρων του παγκρέατος. Επίσης, προάγει τον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων in vivo και τη σύνθεση του DNA σε κυτταροκαλλιέργειες. (104)

CC. Λιραγλουτίδη

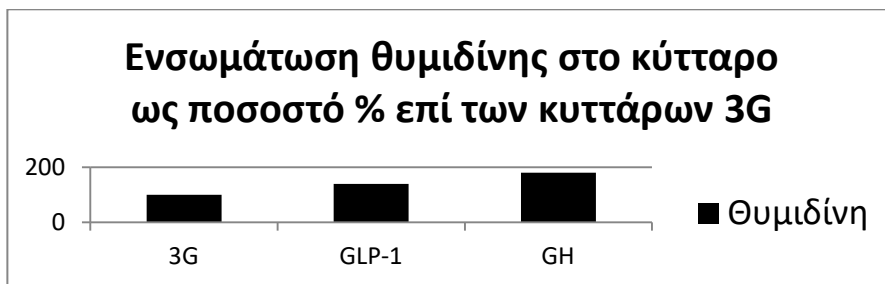
Η λιραγλουτίδη είναι ένα παρατεταμένης δράσης ακετυλο-GLP-1 ανάλογο και ενεργεί ως πλήρης αγωνιστής προς τον GLP-1 υποδοχέα. Είναι ανάλογο του ανθρώπινου μορίου του GLP-1. Η ασφάλεια στη χρήση του έχει τεκμηριωθεί μέσα από πολυκεντρικές μελέτες. Η προσθήκη λιραγλουτίδης στην αγωγή διαβητικών τύπου 2, οι οποίοι ήδη λαμβάνουν πλήρη αγωγή με μετφορμίνη και σουλφονουλουρία, βελτιώνει τον γλυκαιμικό έλεγχο. Ελαττώνει τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη και μειώνει το σωματικό βάρος. Από τις κλινικές μελέτες βγαίνει το συμπέρασμα ότι η λιραγλουτίδη είναι αποτελεσματικότερη από την εξενατίδη. (113)

Η λιραγλουτίδη μπόρεσε να διατηρήσει τη μάζα των παγκρεατικών β κυττάρων σε διαβητικά ποντίκια. Χωρίστηκε ο πληθυσμός των πειραματόζων σε δύο ομάδες. Στην πρώτη χορηγήθηκε λιραγλουτίδη για δύο ημέρες και στη δεύτερη καθημερινά για δύο συνεχόμενες εβδομάδες. Η θεραπεία με λιραγλουτίδη για δύο εβδομάδες αύξησε την ευαισθησία των ποντικών στην ινσουλίνη και αύξησε την έκκριση ινσουλίνης στο ερέθισμα της γλυκόζης. Ακόμη, αύξησε την περιεκτικότητα των β κυττάρων σε ινσουλίνη και μείωσε την περιεκτικότητα σε τριακυλογλυκερόλη. Αυτό είναι σημαντικό γιατί έτσι μπορούν τα κύτταρα να μειώσουν τα παραγόμενα

λιπαρά οξέα και τη λιπτοτοξικότητα που προκύπτει από αυτά. Προώθησε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό. Μείωσε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την προ-απόπτωση των κυττάρων και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η θεραπεία για δύο ημέρες βελτίωσε μόνο το γονιδιακό προφίλ των κυττάρων, χωρίς να επηρεάσει εμφανώς ούτε την παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης, ούτε τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. (114)

Η λιραγλουτίδη φαίνεται ότι βοηθά στην προσαρμογή του κυττάρου στο μεταβολικό στρες. Ο όρος λιπτοτοξικότητα αναφέρεται στην άμεση τοξική επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα β κύτταρα. Η λιπτοτοξικότητα μετρήθηκε στα κύτταρα INS-1, που προέρχονται από ινσουλίνωμα των ποντικών, και βρέθηκε ότι η επιβίωση πέφτει κάτω από 60%. Με την προσθήκη λιραγλουτίδης στο θεραπευτικό υλικό, η επιβίωση διατηρείται σταθερή στο 60%. Πιθανός προστατευτικός μηχανισμός είναι η προώθηση του σχηματισμού λυσοσωμάτων και αυτοφαγοσωμάτων από τη λιραγλουτίδη. Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο καταστρέφει τα τοξικά προϊόντα και τα μη λειτουργικά οργανίδια. Ταυτόχρονα αποδομεί τις ελαττωματικές πρωτεΐνες και έτσι μειώνει το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης η λιραγλουτίδη μειώνει το οξειδωτικό στρες, χάρη στη μειωμένη έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων και γονιδίων σύνθεσης λιπιδίων. (115)

Είναι φανερό ότι η πρωτεΐνη GLP-1 και τα ανάλογά της ασκούν έντονη επίδραση πάνω στον μεταβολισμό των β κυττάρων. Η προστατευτική τους δράση ενάντια σε περιβαλλοντικά στρες φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση των β κυττάρων. Η αντι-αποπτωτική δράση στα β κύτταρα του GLP-1 έχει μελετηθεί σε καλλιέργειες κυττάρων τρωκτικών και σε καλλιέργειες ανθρώπινων β κυττάρων. Προώθηση της διαφοροποίησης προς β κύτταρα προκαλούν ο μεταγραφικός παράγοντας PDX-1, η επαφή κύτταρο με κύτταρο και το GLP-1. Οι αγωνιστές του υποδοχέα GLP-1, εξενατίδη και λιραγλουτίδη, είναι ισχυρότερα μόρια που επάγουν και την αύξηση της μάζας των β κυττάρων.



Εικόνα 6. Το GLP-1 δρα όπως και η αυξητική ορμόνη GH. Και τα δύο αυξάνουν τη σύνθεση του DNA, η οποία αποκαλύπτεται από την κατανάλωση θυμιδίνης. Τα 3G κύτταρα αποτελούν τους μάρτυρες του πειράματος. Προσαρμογή από Buteau J, 1999. (116)

DD. Επίδραση του GLP-1 και των αναλόγων του στα μονοκύτταρα

Το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1 [Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)] επηρεάζει τον μεταβολισμό των μονοκυττάρων. Η καλλιέργεια απομονωμένων μονοκυττάρων που προέρχονται από διαβητικούς ασθενείς, σε θρεπτικό υλικό με GLP-1 in vitro για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των υποδοχέων ινσουλίνης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων. Η αύξηση των υποδοχέων ινσουλίνης είναι στατιστικώς σημαντική, σε σύγκριση με τους υποδοχείς των μονοκυττάρων που προέρχονται από μη διαβητικούς. Ταυτόχρονα, το GLP-1 αύξησε στατιστικώς σημαντικά τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των μονοκυττάρων που συνδέονται με την προΐνσουλίνη. (117)

Η εξενατίδη επηρεάζει τον μεταβολισμό των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων. Μειώνει τη φλεγμονώδη αντίδρασή τους. Πιθανότατα καταστέλλει τη Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) κίνηση και τα μεταβολικά μονοπάτια που ξεκινούν από αυτή. (118)

ΙΧ. Η ΕΥΝΟΪΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΝΚΡΕΤΙΝΩΝ ΣΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Η θεραπεία με τα ανάλογα του GLP-1 βελτιώνει τις ψωριασικές δερματικές βλάβες, αυξάνει τον αριθμό των κυκλοφορούντων αδιαφοροποίητων iNKT κυττάρων (invariant Natural Killer Cells) και ρυθμίζει την έκκριση κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα προκαλούνται αφενός από τη μείωση του βάρους και τη βελτίωση του γλυκαιμικού δείκτη και αφετέρου από άμεση επίδραση στους υποδοχείς GLP-1 των iNKT κυττάρων. Τα iNKT κύτταρα είναι μέρος του κυτταρικού ανοσοποιητικού συστήματος και είναι ελαττωμένα σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα. (119)

Ο διαβήτης τύπου 2 και η παχυσαρκία συναντώνται συχνότερα σε άτομα με ψωρίαση. Η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη ψωρίασης και δυσχεραίνει τη θεραπεία της. Τυχαίοποιημένες μελέτες έδειξαν ότι η απώλεια βάρους μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα της ψωρίασης. Η λιραγλουτίδη μείωσε την έκταση των ψωριασικών βλαβών και τα γενικότερα συμπτώματα της ψωρίασης. Επίσης η λιραγλουτίδη αύξησε τον αριθμό των κυκλοφορούντων αδιαφοροποίητων iNKT κυττάρων. Αυτό δείχνει ότι η λιραγλουτίδη έχει και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες.

Η θεραπεία με λιραγλουτίδη βελτίωσε τα ψωριασικά συμπτώματα και την ποιότητα ζωής σε 7 ασθενείς με συνοδά νοσήματα τον σακχαρώδη διαβήτη και την παχυσαρκία. Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι μειώθηκε η παραγωγή TNF-α και πιθανότατα συνέβαλε και αυτό στη βελτίωση της ποιότητας ζωής. (120)

X. Η ευνοϊκή επίδραση των ινκρετινών στην αναστολή της αθηρογένεσης

Η οξειδωμένη LDL λιποπρωτεΐνη (low density lipoprotein) είναι σημαντικός παράγοντας της αθηρογένεσης. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν την οξειδωμένη LDL μέσω των υποδοχέων scavenger receptors (SR) που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Η πρόσληψη της LDL προκαλεί την αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και ορισμένων αυξητικών παραγόντων που συμβάλλουν στην αθηρογένεση. Η μείωση της οξειδωμένης LDL μειώνει σημαντικά την αθηρογένεση.

Η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) ενεργοποιείται από το κυκλικό AMP. Η ενεργοποίηση της PKA μειώνει τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Μελετήθηκε η επίδραση που έχει η οξειδωμένη LDL στην μείωση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (PKA) και η επίδραση που έχει η λιραγλουτίδη στην αύξηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A.

Η μελέτη έγινε σε καλλιέργεια μονοκυττάρων και μακροφάγων στην οποία προστέθηκε λιραγλουτίδη και στη συνέχεια οξειδωμένη LDL. Βρέθηκε ότι η οξειδωμένη LDL είναι υπεύθυνη για την αύξηση των scavenger receptors στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, τη μεγαλύτερη πρόσληψη οξειδωμένης LDL από αυτά και στη συνέχεια στην ακόμη μεγαλύτερη αύξηση των scavenger receptors. Αυτός ο φαύλος κύκλος οδηγεί στη γρήγορη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Παράλληλα μειώνονται οι GLP-1R υποδοχείς στην επιφάνεια των μονοκυττάρων.

Η χορήγηση GLP-1 ή λιραγλουτίδης αυξάνει τον αριθμό των GLP-1R υποδοχέων στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και μειώνει τον αριθμό των scavenger receptors. Στη συνέχεια μειώνει την πρόσληψη οξειδωμένης LDL και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Ο υποδοχέας scavenger receptor που επηρεάζεται είναι ο CD36. Οι υποδοχείς scavenger receptors

που δεν επηρεάζονται από το GLP-1 είναι η SR-A και η LOX-1. Αυτό σημαίνει ότι το GLP-1 δεν μπορεί να σταματήσει πλήρως τη διαδικασία αθηροσκλήρωσης.

Το GLP-1 αυξάνει την έκκριση της ινσουλίνης των παγκρεατικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A. Το GLP-1 αυξάνει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου NO μέσω της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A. Ομοίως, το GLP-1 και η λιραγλουτίδη μειώνουν τον αριθμό των scavenger receptors CD36 και την πρόσληψη οξειδωμένης LDL μέσω της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A στα ανθρώπινα μονοκύτταρα. (121)

Η αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος του αγγειακού συστήματος και τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Η διπεπτιλ-διπεπτιδάση 4 (DPP4) είναι μία φλεγμονώδης κυτταροκίνη που αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα CD26. Η αύξηση του CD26 αυξάνει τα επίπεδα του TNF-α και ιντερλευκίνης-6 (IL-6) στα ανθρώπινα μονοκύτταρα.

Οι ινκρετίνες αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα κυκλικού AMP (cAMP) και αυτό είναι το δεύτερο μήνυμα που οδηγεί σε αλλαγές τον κυτταρικό μεταβολισμό. Οι υποδοχείς του GLP-1 και του GIP είναι παρόντες στα μονοκύτταρα των ανθρώπων και των ποντικών, αλλά είναι πολύ σημαντικά μειωμένα όταν τα κύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα. Επομένως οι ινκρετίνες έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες διακόπτονται με τρεις τρόπους: τη χορήγηση αναστολέων των υποδοχέων των ινκρετινών, τη χορήγηση αναστολέων του κυκλικού AMP, τη χορήγηση αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης A. Το παραπάνω δείχνει και τον μηχανισμό μέσω του οποίου δρουν οι ινκρετίνες.

Τα λιποπολυσακχαρίδια (LPS) αυξάνουν την παραγωγή ιντερλευκίνης 1 και 6 από τα μονοκύτταρα. Η χορήγηση ινκρετινών μπορεί να διακόψει την παραγωγή αυτών των ιντερλευκινών χωρίς να επηρεάσει τη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το ίδιο αποτέλεσμα προκαλούν και οι αναστολείς του ενζύμου DPP-4.

Το GLP-1 και οι αναστολείς του DPP-4 μπορούν να αλλάξουν το προφίλ των μακροφάγων από τον φαινότυπο M1 στον φαινότυπο M2. Ο φαινότυπος M1 σχετίζεται με τη διατήρηση της φλεγμονής και την καταστροφή μικροβίων, ενώ ο φαινότυπος M2 σχετίζεται με την επιδιόρθωση των ιστών. (122, 123)

Οι αρνητικές επιδράσεις της παχυσαρκίας στον καρδιακό μυ περιλαμβάνουν τη φλεγμονή, την υπερτροφία του καρδιακού μυός και τον μειωμένο μεταβολισμό σε κυτταρικό επίπεδο. Το GLP-1 έχει κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες που μειώνουν τη φλεγμονή και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου.

Χορηγήθηκε δίαιτα με 45% λιπαρά (High Fat Diet-HFD) σε C57B16

ποντικούς ή χορηγήθηκε κανονική δίαιτα με λιγότερα λιπαρά. Οι ποντικοί με τη δίαιτα με υψηλά λιπαρά αύξησαν το βάρος του σώματός τους σε σχέση με τους ποντικούς που σιτίζονταν με την κανονική δίαιτα. Η διαφορά του βάρους ξεπέρασε το 60% όταν το πείραμα έφτασε στις 32 εβδομάδες. Διαπιστώθηκε μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και συσσώρευση καρδιακού κεραμιδίου.

Χορηγήθηκε στους ποντικούς HFD (High Fat Diet) επί μία εβδομάδα λιραγλουτίδη σε συγκέντρωση 30 µg/kg σωματικού βάρους. Δεν μειώθηκε το βάρος τους, αλλά βελτιώθηκε η ευαισθησία τους στην ινσουλίνη, μειώθηκε η έκφραση του tumor-necrosis-factor α (TNF- α), του nuclear-factor-kappa B, αυξήθηκε η δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), μειώθηκε η καρδιακή υπερτροφία και ίνωση. Η σύγκριση έγινε με ποντικούς σε HFD που έλαβαν ένεση με placebo.

Η χορήγηση λιραγλουτίδης βελτίωσε το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου των καρδιακών κυττάρων και βελτίωσε και την καρδιακή λειτουργία μέσω του μηχανισμού αύξησης του AMP και της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (PKA).

Η χορήγηση λιραγλουτίδης 100 nmol/lit προστάτεψε τα μυοκαρδιακά κύτταρα των ποντικών και τα στεφανιαία λεία μυϊκά κύτταρα των ανθρώπων από τη λιπτοτοξικότητα του παλμιτικού οξέος. Επίσης ανέστειλε την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκκρίνουν TNF- α in vitro.

Άρα η χορήγηση λιραγλουτίδης επί μία εβδομάδα ενεργοποιεί καρδιοπροστατευτικά μεταβολικά μονοπάτια. Διατηρεί την ευαισθησία στην ινσουλίνη, μειώνει την ενδοκυττάρια φλεγμονή, μειώνει την αγγειακή προσκόλληση των μονοκυττάρων και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία in vivo μέσω της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A.

Η υπερβολική λήψη θερμίδων από λιπαρές τροφές μπορεί να οδηγήσει σε παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία, μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η δίαιτα με αυξημένα λιπαρά μπορεί να επηρεάσει την καρδιακή λειτουργία άμεσα, πριν την εμφάνιση μειωμένης ευαισθησίας στη γλυκόζη. Προκαλεί φλεγμονή, υπερτροφία, ίνωση και συστολική δυσλειτουργία των καρδιακών κυττάρων.

Μία εβδομάδα θεραπεία με λιραγλουτίδη δεν επηρέασε το σωματικό βάρος. Βελτίωσε όμως τον κυτταρικό μεταβολισμό: α) αύξησε την ευαισθησία στην ινσουλίνη, β) μείωσε την έκφραση φλεγμονωδών δεικτών, γ) μείωσε το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, δ) ομαλοποίησε τον μεταβολισμό των καρδιακών κυττάρων, ε) αύξησε τα επίπεδα του αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου, ε) αύξησε τα επίπεδα του προκολλαγόνου 1 A1, στ) μείωσε τους δείκτες υπερτροφίας, ζ) μείωσε την περιαγγειακή ίνωση, η) βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A.

Οι κυτταρικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας είναι η AMPK, Akt, GSK-3β, ERK1/2 και η p38 πρωτεϊνική κινάση. Η διατροφή με υψηλά λιπαρά οδήγησε σε αποφωσφοριλίωση της AMPKA, GSK-3β και της ERK1/2. Η χορήγηση λιραγλουτίδης αποκατέστησε τη λειτουργικότητα των παραπάνω πρωτεϊνών. Η λιραγλουτίδη αυξάνει τη φωσφοριλίωση της AMPK σε παρόμοια επίπεδα με τη μετφορμίνη. (124)

Ο σχηματισμός αφρωδών κυτάρων από τα μακροφάγα προκαλείται από τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης και καταλύεται από το ένζυμο ακυλτρανσφεράση της χοληστερόλης 1 (ACAT1). Αυτό είναι το πρώτο βήμα της αθηρογένεσης. Το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο πεπτιδίδιο-1 (GLP-1) και το Γλυκοζο-Εξαρτώμενο Ινσουλινοτρόφο Πολυπεπτιδίδιο (GIP) μειώνουν την ανάπτυξη της αθηρογένεσης. Το μοντέλο που έχει μελετηθεί κυρίως είναι το μοντέλο του ποντικού με συγγενή έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E (απο E -/-), το οποίο αναπτύσσει νωρίς αθηροσκληρωτικές βλάβες στα αγγεία.

Σε ποντικούς απο E -/- με ηλικία 17 εβδομάδες χορηγήθηκε λιραγλουτίδη με οσμωτική μίνι αντλία για 4 εβδομάδες. Μειώθηκε σημαντικά η δημιουργία αφρωδών κυτάρων από την οξειδωμένη LDL, επειδή μειώθηκε η ενεργότητα του ενζύμου ACAT1. Μακροσκοπικά καθυστέρησε η εξέλιξη των αθηροσκληρωτικών βλαβών.

Οι υποδοχείς για το GLP-1 και το GIP εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα ανθρώπινα κύτταρα των λείων μυϊκών κυττάρων της αορτής και στα μονοκύτταρα. Αντίθετα, εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στα ανθρώπινα μακροφάγα και στα αφρώδη κύτταρα.

Η απομόνωση των ανθρώπινων μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα έγινε με το αντίσωμα anti-CD14 το οποίο ήταν συνδεδεμένο με μαγνητικά σφαιρίδια. Αυτή η μέθοδος οδήγησε σε 98%-100% καθαρό πληθυσμό μονοκυττάρων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό RPMI-1640 με την προσθήκη 10% ανθρώπινου ορού. Από την αρχή των καλλιεργειών χορηγήθηκε στα κύτταρα GLP-1, GIP, exendin-4 ή λιραγλουτίδη. Επίσης προστέθηκε μικρή δόση βιλνταγλιπτίνης, ώστε να αποτραπεί η αποδόμηση των ινκρετινών.

Το mRNA από τα εξώνια 1-13 του υποδοχέα του GLP-1 εκφράζεται στα ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής σε υψηλά επίπεδα. Εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα στα μακροφάγα και δεν ανιχνεύεται στα αφρώδη κύτταρα.

Το mRNA από τα εξώνια 1-14 του υποδοχέα του GIP εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ανθρώπινα μονοκύτταρα. Εκφράζεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής, στα μακροφάγα και στα αφρώδη κύτταρα.

Οι πρωτεΐνες GLP-1, GIP, exendin-4 και λιραγλουτίδη μειώνουν τη δημιουργία αφρώδων κυττάρων επειδή μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου ACAT1, τον αριθμό των υποδοχέων CD36 και αυξάνουν την ενεργότητα του ενζύμου ABCA1.

Η ικανότητα των ινκρετινών να μειώνουν τα αφρώδη κύτταρα μειώνεται σημαντικά όταν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας απουσιάζει ο αναστολέας του DPP-4. Η δράση των ινκρετινών *in vitro* ενισχύεται σημαντικά από την προσθήκη αναστολέα του DPP-4.

Η χορήγηση GLP-1 αναλόγου επηρέασε τα μονοκύτταρα τα οποία δεν προσκολλήθηκαν στα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν χορηγήθηκε TNF-α ως χημειοτακτικός παράγοντας. Με αυτό τον τρόπο έγινε αναστολή της αθηρογόνου διαδικασίας. Δεν επηρέασε όμως τα μακροφάγα, τα οποία μετατράπηκαν σε αφρώδη κύτταρα όταν ήρθαν σε επαφή με οξειδωμένη LDL. (125)

Η λιποπολυσακχαρίδη (LPS) είναι μία ουσία που μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση και να κινητοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα. Η χορήγηση LPS στα ποντίκια μπορεί να προκαλέσει σηπτική καταπληξία με θρομβοκυτταροπενία, μικροαγγειακές θρομβώσεις στην πνευμονική κυκλοφορία, αυξημένη ενεργότητα γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH), διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθελίου και αυξημένους δείκτες φλεγμονής στα κύτταρα της αορτής και στα λευκά αιμοσφαίρια. Η θεραπεία με αναστολέα DPP-4 ή χορήγηση GLP-1 αναλόγου ή η γενετική έλλειψη του ενζύμου DPP4 μείωσε τις βλάβες από τη σηπτική καταπληξία και βελτίωσε την πρόγνωση. Όταν λείπει ο υποδοχέας του GLP-1, ο αναστολέας του DPP-4 και η χορήγηση GLP-1 αναλόγου δεν μείωσαν τις βλάβες από τη σηπτική καταπληξία.

Σε κυτταρικό επίπεδο, όταν έγινε συγκαλλιέργεια αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων με την παρουσία GLP-1 αναλόγου, τότε αυξήθηκαν τα επίπεδα του cAMP και ενεργοποιήθηκε η πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Αυτό οδήγησε σε μείωση της παραγωγής των φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα και σε μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα GLP-1 των αιμοπεταλίων από τη λιναγλιπτίνη και τη λιραγλουτίδη μείωσε σημαντικά τη μικροαγγειακή θρόμβωση, τη συστηματική φλεγμονή, τη δυσλειτουργία των αγγείων, τη βλάβη των οργάνων και τελικά τη θνητότητα. Τα ευνοϊκά αποτελέσματα προκαλούνται από την αύξηση του ενδοκυττάρου cAMP και την ενεργοποίηση της PKA.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα του GLP-1 αύξησε το ενδοκυττάριο cAMP και ενεργοποίησε την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) στα αιμοπετάλια. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και τη μείωση της ενδοκυττάριας θρόμβωσης.

Για τη μελέτη *in vitro* χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μονοκυττάρων

Monomac-1. Χορηγήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified eagle's medium και προστέθηκε ορός από έμβρυο βοός 10% (fetal calf serum). Επίσης προστέθηκε υποξανθίνη, μεθοτρεξάτη και θυμίνη.

Επίσης βρέθηκε ότι η αναστολή του ενζύμου DPP-4 σχετίζεται με τη μειωμένη ενεργότητα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), άρα σχετίζεται και με μειωμένη αγγειοδιαστολή στη σηπτική καταπληξία.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα από τη μείωση της γλυκόζης του αίματος που προκαλεί το GLP-1 και τα ανάλογά του. Στους ποντικούς με σηπτική καταπληξία τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος και η γλυκοζιλιωμένη αιμοσφαιρίνη δεν μειώθηκαν με τη χορήγηση λιναγλιπτίνης.

Έγινε απομόνωση αιμοπεταλίων από ανθρώπους και ποντικούς. Ο υποδοχέας του GLP-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ανακαλύφθηκε με την τεχνική western blot. Με τον ίδιο τρόπο ανακαλύφθηκε ο υποδοχέας του GLP-1 στην επιφάνεια των ανθρώπινων μονοκυττάρων.

Η αναστολή του ενζύμου DPP-4 από τη λιναγλιπτίνη ή η χορήγηση λιραγλουτίδης μειώνουν την πτώση των αιμοπεταλίων και ομαλοποιούν την ενεργότητα της LDH. Αυτοί οι δείκτες αντανακλούν τη βελτίωση της λειτουργίας των οργάνων και τη βελτίωση της επιβίωσης.

Η αντιφλεγμονώδης και αντιθρομβωτική δράση του GLP-1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της πρόγνωσης των σηπτικών ασθενών. (126)

XI. ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ GLUT ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Οι GLUT πρωτεϊνικοί μεταφορείς βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων και ρυθμίζουν την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα. Οι περισσότεροι μεταφορείς μπορούν να μεταφέρουν γλυκόζη και προς τις δύο κατευθύνσεις με τη χρήση ενέργειας. Έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο 14 διαφορετικοί GLUT μεταφορείς.

Glut 1

Είναι ο πιο μελετημένος από όλους τους μεταφορείς γλυκόζης. Βρίσκεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στον καρδιακό μυ. Ο υποδοχέας συχνά υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις ογκογένεσης.

Glut 2

Εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα παγκρεατικά β κύτταρα, στις μεμβράνες των ηπατικών και των νεφρικών κυττάρων. Ο υποδοχέας εξασφαλίζει γρήγορη ισορροπία μεταξύ της εξωκυττάριας και της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης γλυκόζης. Ο υποδοχέας εκφράζεται και στο έντερο σε περίπτωση που υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης στον αυλό.

Glut 3

Είναι ο μεταφορέας που βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια με τη γλυκόζη και μπορεί να τη μεταφέρει ταχέως στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης βρίσκεται στους όρχεις και μεταφέρει γλυκόζη στα κύτταρα που παράγουν το σπέρμα. Επιπρόσθετα, βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και αιμοπετάλια. Σε αυτά τα κύτταρα, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε κυστίδια, τα οποία ανεβαίνουν στη μεμβράνη του κυττάρου ύστερα από ενεργοποίηση των κυττάρων. Απουσία του Glut 3 μεταφορέα προκαλεί απόπτωση στα εμβρυϊκά κύτταρα του ποντικού.

Glut 4

Βρίσκεται αρχικά ενδοκυττάρια στον λιπώδη και στον μυϊκό ιστό. Πρέπει να ενεργοποιηθεί το κύτταρο και να προωθήσει τον μεταφορέα στην επιφάνειά του. Διαταραχές στη φυσιολογική αυτή λειτουργία μπορούν να προκαλέσουν αντίσταση στην ινσουλίνη.

Glut 5

Είναι ο μόνος υποδοχέας που έχει μεγάλη συγγένεια με τη φρουκτόζη. Βρίσκεται στα κύτταρα του εντέρου.

Glut 9

Ο μεταφορέας σχετίζεται με τη μεταφορά του ουρικού οξέος εντός και εκτός των κυττάρων. Βρίσκεται στο ήπαρ, νεφρούς, έντερο και στα χονδροκύτταρα. Η απώλεια του υποδοχέα σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα και αυξημένη έκκριση ουρικού οξέος από τους νεφρούς. Όταν όμως η απώλεια του μεταφορέα περιορίζεται στο ήπαρ, τότε εμφανίζεται υπερουριχαιμία.

Glut 6-8 και 10-14

Λίγα είναι γνωστά για αυτούς τους υποδοχείς. Φαίνεται ότι ο Glut 8 σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων του ιπποκάμπου. Ο Glut 12 σχετίζεται με την ομοιοστάση της γλυκόζης στο πλάσμα. Ο Glut 7 ομοιάζει στον Glut 5. Ο Glut 13 ρυθμίζει τη μεταφορά μυοϊνοσιτόλης στα νευρικά κύτταρα και σχετίζεται με διαταραχές στη διάθεση του ανθρώπου. Ο Glut 14 εκφράζεται στους όρχεις και είναι όμοιος με τον Glut 3. Ο Glut 6 βρίσκεται κυρίως στα λευκοκύτταρα, αλλά δεν έχει προσδιοριστεί ο ρόλος του. Οι υποδοχείς Glut 10 και 11 εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη το κύριο στοιχείο που μεταφέρουν. (127)

XII. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 3 (IL-3) ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (M-CSF)

Ένα υποσύνολο των ανθρώπινων μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος πολλαπλασιάζεται με την παρουσία M-CSF και επιδεικνύει μονοκυτταρικά και αιμοποιητικά επιφανειακά αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων των CD14, CD34 και CD45. Στην εμφάνιση μοιάζουν με ινοβλάστες. Αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται: α. σε ώριμα μακροφάγα με τη βοήθεια λιπποπυλυσασχαριδών (LPS), β. σε T λεμφοκύτταρα με την ιντερλευκίνη 2 (IL-2), γ. σε επιθηλιακά κύτταρα με τον επιδερμικό παράγοντα αύξησης (EGF), δ. σε ενδοθηλιακά κύτταρα με τον ενδοθηλιακό αγγειακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), ε. σε νευρωνικά κύτταρα με τον παράγοντα αύξησης των νεύρων (NGF), και στ. σε ηπατικά κύτταρα με τον παράγοντα αύξησης των ηπατοκυττάρων (HGF). (128)

Ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό αποικίας κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων GM-CSF και ο M-CSF ενισχύουν τις λειτουργίες των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων, δηλαδή τη φαγοκυττάρωση και την ενδοκυτταρική πέψη. Ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα και τις ανοσοποιητικές δραστηριότητες και προωθούν την εξέλιξη των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. (129, 130)

Σε απάντηση στον GM-CSF και στον M-CSF, τα ανθρώπινα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα πειράματα έγιναν με τα τυπικά καλλιεργητικά υλικά στα οποία προστέθηκε εμβρυϊκός βόειος ορός [fetal bovine serum (FBS)]. Ο τελευταίος περιέχει κυττοκίνες και μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Επιπρόσθετα, οι παράγοντες GM-CSF και M-CSF δεν υποστηρίζουν την αποδιαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε προγονικά κύτταρα σε καλλιέργεια χωρίς ορό (serum free). (131-137)

Η ιντερλευκίνη 3 (IL-3) υποκινεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιματοποιητικών προγονικών κυττάρων, των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, ερυθρών και μεγακαρυοκυττάρων. (136)

Κύτταρα που παράγονται με GM-CSF ή IL-3 έχουν φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Κύτταρα που καλλιεργούνται με την παρουσία του GM-CSF ή IL-3, ακολουθούμενη από την προσθήκη του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), εμφανίζουν φαινότυπο ώριμων δενδριτικών κυττάρων που ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα.

Όταν καλλιεργούνται με την παρουσία ταυτόχρονα του GM-CSF και της IL-3, τα μονοκύτταρα δεν διαφοροποιούνται σε μακροφάγα αλλά σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (DCS). Επιπλέον, ο συνδυασμός GM-CSF και IL-3 εμποδίζει την M-CSF εξαρτώμενη διαφοροποίηση σε μακροφάγα και προωθεί τη διαφοροποίηση στο ανώριμο δενδριτικό κύτταρο. Αυτά τα

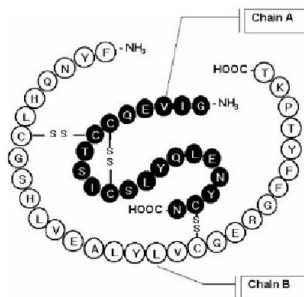
αποτελέσματα δείχνουν ότι η αρχική δραστηριότητα των GM-CSF και IL-3 στα μονοκύτταρα είναι να υποστηρίξουν τη διαφοροποίηση σε δενδριτικά κύτταρα και όχι σε μακροφάγα. Η προσθήκη fetal bovine serum στις καλλιέργειες χωρίς ορό αποκατέστησε τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. (137)

XIII. 2 – ΜΕΡΚΑΠΤΟΑΙΘΑΝΟΛΗ

Η 2-Μερκαπτοαιθανόλη θεωρείται φυσικό αντιοξειδωτικό επειδή αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου. Επιπρόσθετα, μπορεί να διασπάσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Είναι απαραίτητη σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων και άλλων κυτταρικών καλλιιεργειών, διότι το απαραίτητο αμινοξύ κυστεΐνη παρέχεται σε μικρή ποσότητα στα καλλιιεργητικά θρεπτικά υλικά. Αντίθετα, τα θρεπτικά υλικά είναι πλούσια σε κυστεΐνη.

Για παράδειγμα, τα T λεμφοκύτταρα είναι ανάκανα να μεταφέρουν την κυστεΐνη μέσα στο κυτταρόπλασμα για να τη μετατρέψουν σε κυστεΐνη. Η 2-Μερκαπτοαιθανόλη μπορεί να διασπάσει την κυστεΐνη σε προϊόντα που είναι απορροφήσιμα από τα κύτταρα, ώστε στη συνέχεια να τη μετατρέψουν σε κυστεΐνη που είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη.

Ένας άλλος λόγος για τη χρήση της 2-Μερκαπτοαιθανόλης είναι ότι μπορεί να διασπάσει πολλούς τοξικούς μεταβολίτες που παράγονται από τα κύτταρα στις καλλιέργειες και έτσι να βελτιώσει το περιβάλλον διαβίωσης των κυττάρων. Επίσης, η μερκαπτοαιθανόλη μπορεί να διατηρήσει τη δραστηριότητα ορισμένων αυξητικών παραγόντων. Η μερκαπτοαιθανόλη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια παραγωγής της ινσουλίνης, διότι τη διασπά σε δύο αλυσίδες.



Εικόνα 7. Η δομή του μορίου της ινσουλίνης. Η μαύρη αλυσίδα δηλώνει την Α αλυσίδα και η άσπρη τη Β. (138)

XIV. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Τα ενδοκρινή παγκρεατικά β κύτταρα απαιτούν τα ενδοθηλιακά σήματα για τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία τους. Εντούτοις, η μοριακή βάση για τέτοια σήματα παραμένει άγνωστη. Φαίνεται ότι τα β κύτταρα, σε αντίθεση με τα εξωκρινή παγκρεατικά κύτταρα, δεν διαμορφώνουν μια βασική μεμβράνη. Με την απελευθέρωση του VEGF-α, προσελκύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία διαμορφώνουν τα τριχοειδή αγγεία με μια βασική αγγειακή μεμβράνη δίπλα στα β κύτταρα. Οι λαμινίνες δρουν ως ενδοθηλιακά σήματα, τα οποία προωθούν την έκφραση και τον πολλαπλασιασμό γονιδίων ινσουλίνης στα β κύτταρα. Η b1-ιντεγκρίνη απαιτείται για την απάντηση κυττάρων β στη λαμινίνη.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός εξηγεί γιατί τα β κύτταρα πρέπει να αλληλεπιδράσουν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαμορφώνουν μια βασική μεμβράνη δίπλα στα β κύτταρα που περιέχει λαμινίνη, κολλαγόνο IV και φιμπρονεκτίνη. Η βασική μεμβράνη περιέχει σήματα που προωθούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων β και την έκφραση γονιδίων ινσουλίνης σε διαφορετικό βαθμό. Για να είναι αποτελεσματικές οι λαμινίνες στα β κύτταρα, απαιτούν b1-ιντεγκρίνη. Σε μεταλλαγμένα νησίδια β κυττάρων στα οποία το VEGF-α λείπει, καμία αγγειακή βασική μεμβράνη δεν διαμορφώνεται. Σε αυτά τα μεταλλαγμένα νησίδια, τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων ινσουλίνης και τα ποσοστά πολλαπλασιασμού κυττάρων β μειώνονται και μπορούν να διασωθούν μερικώς από την προσθήκη εξωγενών λαμινινών.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η κάψα των νησιδίων αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική, μη αγγειακή πηγή λαμινίνης και κολλαγόνου IV. Εντούτοις, λόγω της σφαιρικής δομής των νησιδίων, τα περισσότερα β κύτταρα δεν έρχονται σε επαφή με την κάψα. Επομένως, απαιτούν αυστηρά την αγγειακή βασική μεμβράνη για να λειτουργήσουν σωστά.

Το προτεινόμενο πρότυπο παρέχει ερμηνεία για τις ακόλουθες παρατηρήσεις: Κατ' αρχάς, τα παγκρεατικά νησίδια, όπως άλλοι ενδοκρινείς αδένες, εκφράζουν τα υψηλά επίπεδα VEGF. Δεύτερον, τα νησίδια διατηρούν ένα τριχοειδές δίκτυο που είναι πέντε φορές πυκνότερο από αυτό του εξωκρινούς παγκρεατικού ιστού και επομένως υπερβαίνει τη γενική απαίτηση του ιστού για το αγγειακό δίκτυο. Και τρίτον, η υπερέκφραση του VEGF-α στα νησίδια βελτιώνει την επιβίωσή τους, έπειτα από τη θεραπευτική μεταμόσχευσή τους. (139-141)

Η έρευνα σχετικά με τη μεταμόσχευση νησιδίων του παγκρέατος έχει δείξει ότι τα μεταμοσχευμένα νησίδια χρειάζονται 1-2 εβδομάδες για να επαναγγειωθούν στον δέκτη. Έχει προταθεί ότι πολλά νησίδια χάνουν την ενδοκρινή λειτουργία τους κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού πλαισίου, που εξηγεί γιατί οι υψηλότεροι από το απαιτούμενο αριθμοί νησιδίων

απαιτούνται για τη μεταμόσχευση.

Η επεξεργασία των νησιδίων με τις πρωτεΐνες μεμβρανών βελτιώνει τη μεταμόσχευση νησιδίων. Η εξωγενής χορήγηση λαμινίνης μπορεί να βοηθήσει να επιβιώσουν τα μεταμοσχευμένα νησίδια, έως ότου διαμορφώσουν νέα τριχοειδή αγγεία και νέες αγγειακές μεμβράνες. Επιπλέον, η τεχνητή λαμινίνη-111 μπορεί μερικώς να αντικαταστήσει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυτό δείχνει ότι δεν είναι απαραίτητη η φυσική λαμινίνη. (142)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

XV. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

ΕΕ. Σκοπιμότητα της διδακτορικής διατριβής

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας για την κοινωνία και η συχνότητά του στον γενικό πληθυσμό αυξάνεται. Η φαρμακευτική αγωγή του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνει αντιδιαβητικά δισκία και ενέσεις ινσουλίνης. Όμως, η χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων χρειάζεται παρακολούθηση της γλυκόζης του αίματος και συχνή ρύθμιση της δοσολογίας. Οι ενέσεις ινσουλίνης δυσκολεύουν ιδιαίτερα τους ηλικιωμένους στη χρήση τους. Μπορεί να προκληθούν υπογλυκαιμίες που είναι επικίνδυνες για τη ζωή του ασθενούς. Επίσης, οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη προχωρούν ακόμη και με τη λήψη της φαρμακευτικής αγωγής.

Συνεπώς υπάρχει ανάγκη για την εύρεση καινούργιων μεθόδων θεραπείας του σακχαρώδους διαβήτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν σήμερα οι θεραπείες αναπλήρωσης των νησιδίων του παγκρέατος με τη χρήση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ή βλαστικών κυττάρων των ιστών. Η χρήση αυτών των κυττάρων περιορίζεται από τον μικρό αριθμό τους in vivo, την έλλειψη ειδικών δεικτών για να τα διαχωρίσουμε και τον δύσκολο πολλαπλασιασμό τους σε καλλιέργειες. Είναι δύσκολο να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν. Έχουν απροσδιόριστο χρόνο ζωής in vivo, διότι μπορούν να αυτοανανεώνονται. Είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος ογκογένεσης. (143)

Τα Μεγάλα Μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι άμεσα προσβάσιμα. Μπορούμε να πάρουμε επαρκείς ποσότητες με μια απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος. Δεν χρειάζονται αποθήκευση σε τράπεζες κυττάρων, διότι είναι ανά πάσα στιγμή διαθέσιμα. Δεν θέτουν ηθικά διλήμματα, όπως τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που αποτελούν τμήμα μιας νέας ανθρώπινης ζωής. Έχουν μικρότερες πιθανότητες ογκογένεσης συγκρινόμενα με τα βλαστικά κύτταρα. Ο φυσιολογικός χρόνος ζωής των Μεγάλων Μονοκυττάρων ανέρχεται σε μερικούς μήνες.

Τα Μεγάλα Μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, υπό την επίδραση κατάλληλων παραγόντων, μπορούν να επαναπρογραμματιστούν προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Η παραγωγή ινσουλίνης από τα Μεγάλα Μονοκύτταρα γίνεται σε πολύ μικρότερο επίπεδο σε σχέση με εκείνο των ώριμων β κυττάρων του παγκρέατος, στην ίδια συγκέντρωση γλυκόζης. (79)

Παρ' όλα αυτά, τα παραπάνω επαναπρογραμματισμένα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν με επιτυχία τη γλυκόζη αίματος διαβητικών ποντικών μέχρι τη στιγμή της ανοσολογικής απόρριψης του μοσχεύματος. (79)

Στον άνθρωπο η μεταμόσχευση αυτή μπορεί να είναι αυτόλογη και να μην υπάρχει απόρριψη. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα ρυθμίζουν διαρκώς τα

επίπεδα σακχάρου μέχρι τη φυσική φθορά τους.

Άρα, τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, αλλά δεν είναι προσδιορισμένες οι συνθήκες καλλιέργειας κάτω από τις οποίες θα καταφέρουν να διαφοροποιηθούν τα μονοκύτταρα προς πολυδύναμα κύτταρα. Επίσης, δεν είναι προσδιορισμένες οι συνθήκες καλλιέργειας που θα επιτρέψουν στα μονοκύτταρα να παράγουν σημαντικές ποσότητες ινσουλίνης.

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτιδίο-1 (Glucagon-Like Peptide-1) διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η διέγερση αυτή επιτυγχάνεται τόσο σε επίπεδο γονιδιακής μεταγραφής, όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης. (144, 145)

FF. Ερευνητικά ερωτήματα

1. Μπορούν το Παρόμοιο-με-Γλουκαγόνο Πεπτιδίο-1 (Glucagon-Like Peptide-1) και τα ανάλογά του να συμβάλλουν στον επαναπρογραμματισμό των Μεγάλων Μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη;
2. Ποια είναι η βέλτιστη μέθοδος για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα;
3. Είναι γλυκοζο-εξαρτώμενη η έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα;
4. Είναι σημαντικό να διαπιστωθεί ποια ποσότητα ινσουλίνης μπορούν να παράγουν τα κύτταρα μονοκυτταρικής προέλευσης με τη βοήθεια των GLP-1 αναλόγων. Μπορεί να αυξηθεί η παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης, ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες ενός ενήλικου;
5. Ποια είναι η διαδικασία που μπορεί να διαφοροποιήσει τα μονοκύτταρα σε κύτταρα πολυδύναμα; Ποιοι παράγοντες είναι καθοριστικοί για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων;
6. Όταν τα μονοκύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά πολυδύναμων κυττάρων, σε ποια κύτταρα μοιάζουν μορφολογικά; Επικοινωνούν με τα γειτονικά κύτταρα; Σχηματίζουν ιστικές δομές;

GG. Ποια είναι η σημασία της αποδοχής ή της απόρριψης των ερευνητικών ερωτημάτων;

Αν μπορεί να παραχθεί ικανή ποσότητα ινσουλίνης από τα διαφοροποιημένα κύτταρα μονοκυτταρικής προέλευσης, τότε ανοίγει ο δρόμος για περαιτέρω κλινικές δοκιμές που θα μπορούσαν να οδηγήσουν ενδεχομένως σε θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 και 2 με αυτόλογη μεταμόσχευση αυτών των κυττάρων στον διαβητικό ασθενή. Σε διαφορετική περίπτωση θα θεωρήσουμε ότι τα μονοκύτταρα δεν είναι κατάλληλα για θεραπείες κυτταρικής αναπλήρωσης.

XVI. ΜΕΘΟΔΟΙ

ΗΗ. Δείγμα

Το δείγμα αποτελείται από τα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Λήφθηκε από νέους υγιείς ενήλικες που έκαναν νηστεία για 8 ώρες. Δεν έπαιρναν φάρμακα και δεν είχαν προβλήματα υγείας. Η μέση ηλικία των δωρητών αίματος είναι 31 ± 4 έτη. Εννέα άντρες και εννέα γυναίκες δώρησαν περιφερικό αίμα με μια απλή αιμοληψία. Το ίδιο αίμα χωρίστηκε σε τέσσερις ομάδες.

Και οι τέσσερις ομάδες καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37 βαθμών Κελσίου και 5% μερικής πίεσης CO₂. Από κάθε ομάδα συλλέχθηκαν δύο δείγματα: Το ένα σε συγκέντρωση γλυκόζης στα 100 mg/dl (5.5 mmol/lit) και το δεύτερο ύστερα από μίας ώρας επώαση σε συγκέντρωση γλυκόζης στα 250 mg/dl (13.88 mmol/lit). Άρα το σύνολο των ομάδων είναι οκτώ (Εικόνα 8).

Όλοι οι δωρητές αίματος ενημερώθηκαν λεπτομερώς και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Όλα τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι, όπως διατυπώθηκε το 2008. Η διατριβή εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (αριθμός απόφασης Α7246, ημερομηνία 23-3-2011).

II. Ερευνητικό πρωτόκολλο

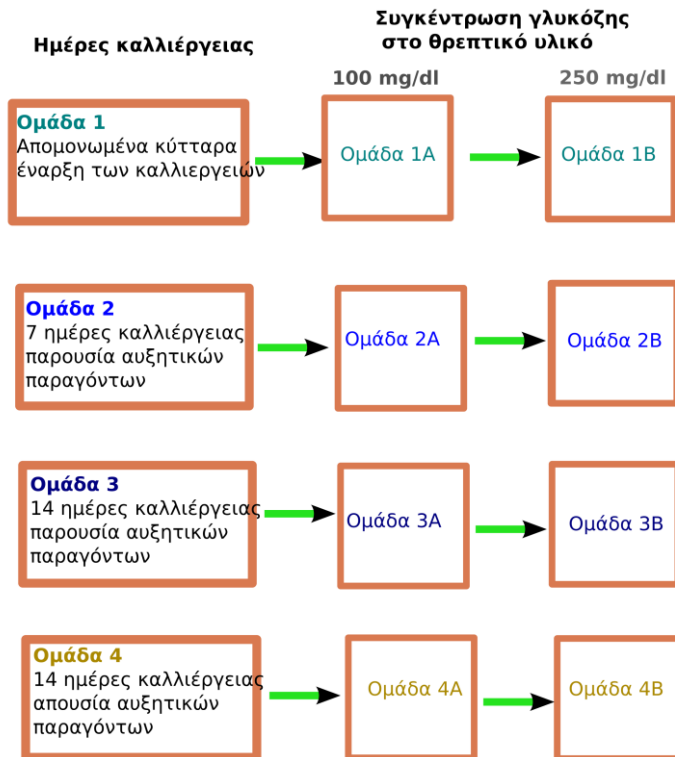
Πληθυσμός: Υγιείς νέοι ενήλικες. Δείγμα από 18 άτομα (9 άντρες και 9 γυναίκες).

Παρέμβαση: Καλλιέργεια μονοκυττάρων (λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων) του περιφερικού αίματος σε τρυβλία. Διάρκεια καλλιέργειας έως 14 ημέρες σε θρεπτικό υλικό είτε με αυξητικούς παράγοντες είτε χωρίς.

Χαρακτηρισμός των κυττάρων: Οπτικό μικροσκόπιο, ιστολογικές χρώσεις, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κυτταρομετρία ροής.

Μετρήσεις: Πρώτον, προσδιορισμός της ποσότητας ινσουλίνης που υπάρχει στο υπερκείμενο των καλλιέργειών. Δεύτερον, προσδιορισμός της έκκρισης ινσουλίνης μετά από εξωγενή χορήγηση γλυκόζης μέσα σε μία ώρα.

Συγκρίσεις: (Α) Συγκρίνονται οι ομάδες 2Α και 3Α ώστε να φανεί αν η **διαφορετική διάρκεια καλλιέργειας** επηρεάζει την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης. (Β) Συγκρίνονται οι ομάδες 2Β και 3Β, ώστε να ελεγχθεί αν οι ομάδες με **διαφορετική διάρκεια καλλιέργειας** αντιδρούν διαφορετικά στην **αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης**. (Γ) Συγκρίνονται οι ομάδες 1Α-1Β, 2Α-2Β, 3Α-3Β, 4Α-4Β ώστε να διαπιστωθεί αν η παραγωγή ινσουλίνης επηρεάζεται από την **αύξηση του επιπέδου γλυκόζης**. (Δ) Συγκρίνονται οι ομάδες 3Α και 4Α για να διαπιστωθεί αν η **προσθήκη αυξητικών παραγόντων** στην καλλιέργεια επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης.



Εικόνα 8. Διάγραμμα των καλλιέργειών ανάλογα με τον χρόνο της καλλιέργειας και τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Τα μονοκύτταρα και τα

λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από τον ίδιο δότη διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες. Η μέτρηση της ινσουλίνης στα υπερκείμενα των καλλιέργειών γίνεται: α) Ύστερα από την απομόνωσή τους από το περιφερικό αίμα (Ομάδα 1), β) Έπειτα από 7 ημέρες σε καλλιέργεια υπό την παρουσία αυξητικών παραγόντων (Ομάδα 2), γ) Έπειτα από 14 ημέρες σε καλλιέργεια υπό την παρουσία αυξητικών παραγόντων (Ομάδα 3), δ) Έπειτα από 14 ημέρες σε καλλιέργεια χωρίς αυξητικούς παράγοντες (Ομάδα 4). Οι ίδιες ομάδες έχουν ελεγχθεί για έκκριση ινσουλίνης στο υπερκείμενο, πρώτα σε συγκέντρωση γλυκόζης 100 mg/dl (A) και στη συνέχεια 250 mg/dl (B).

JJ. Απομόνωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα

Οι πρώτες προσπάθειες απομόνωσης μονοκυττάρων ξεκίνησαν από τα τέλη του 1960. Οι βασικές αρχές στις οποίες στηρίχθηκε το εγχείρημα είναι η φυγοκέντρηση πάνω σε υλικό με διαβάθμιση πυκνότητας. Στη συνέχεια, αυξάνεται η καθαρότητα του πληθυσμού με την προσκόλληση των μονοκυττάρων σε επιφάνειες.

Ο Boyum (1983) κατάφερε να απομονώσει μονοκύτταρα έπειτα από φυγοκέντρηση σε Nycodenz, ένα υλικό που έχει διαβάθμιση πυκνότητας, με υψηλή καθαρότητα. Το πέτυχε χάρη στη σωστή πυκνότητα του υλικού. Μέχρι σήμερα γίνεται έρευνα σε αυτόν τον τομέα, διότι τα μονοκύτταρα αποτελούν πολύτιμο ερευνητικό υλικό. Οι νεότερες μέθοδοι είναι ελκυστικές όσον αφορά την απλότητά τους και την καθαρότητα του αποτελέσματος που δημοσιεύουν. (146 -149)

Με τη βοήθεια ανοσοσφαιρινών κατακρημνίζονται όλα τα συστατικά του αίματος εκτός από τα μονοκύτταρα (από την εταιρεία Stemcell technologies). Η τα μονοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν μαγνητικά σφαιρίδια και στη συνέχεια απομονώνονται σε ειδικό μηχάνημα (από την εταιρεία Militenyl). Το μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι το υψηλό τους κόστος.

Τα πρωτόκολλα διαχωρισμού απαιτούν μεγάλη ποσότητα αίματος με διαδοχικές ηλεκτροφορήσεις και αρκετό χρόνο στο εργαστήριο. Είναι χρήσιμο να αναφερθεί ένα νέο πρωτόκολλο απομόνωσης μονοκυττάρων που είναι φτηνό, δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, παράγει πληθυσμό μονοκυττάρων με υψηλή καθαρότητα, εφαρμόζεται σε μικρά δείγματα και είναι σύντομο χρονικά. Η αρχή είναι η ίδια όπως και στις υπόλοιπες απομονώσεις με φυγοκέντρηση. Όμως, μόνο η φυγοκέντρηση δεν αρκεί. Τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα έχουν παρόμοια μάζα και πυκνότητα και δεν μπορούν να διαχωριστούν.

Είναι γνωστό ότι τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, όταν βρεθούν σε ένα υλικό με μεγαλύτερη πυκνότητα, για να το διαπεράσουν, αρχίζουν και αποβάλλουν ενδοκυττάριο ύδωρ. Όταν καταφέρουν να μειώσουν αρκετά

την ωσμωτικότητα τους, μπορούν να περάσουν από το εμπόδιο της χαμηλής πυκνότητας. Τα λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη και ταχύτερη ικανότητα να μειώνουν την ωσμωτικότητά τους με αποτέλεσμα να περνούν πρώτα από το εμπόδιο. Αν υπολογιστεί η κατάλληλη στιγμή, όταν τα λεμφοκύτταρα θα έχουν περάσει το εμπόδιο, ενώ ταυτόχρονα τα μονοκύτταρα ακόμη βρίσκονται στην αρχή του, τότε μπορούμε να απομονώσουμε με ασφάλεια τους δύο πληθυσμούς.

Όσο πιο μεγάλη είναι η πυκνότητα και ο χρόνος διαχωρισμού, τόσο πιο μεγάλη είναι η καθαρότητα του πληθυσμού των μονοκυττάρων, αλλά και τόσο μικρότερος ο αριθμός τους. Διότι ένα μέρος των μονοκυττάρων περνάει το φράγμα πυκνότητας μαζί με τα λεμφοκύτταρα. Επίσης, εκτός από τον αρχικό διαχωρισμό είναι σημαντικό να αφαιρεθούν τα αιμοπετάλια τα οποία βρίσκονται σε όλο το υπερκείμενο, άρα και στη ζώνη που βρίσκονται τα μονοκύτταρα. (149)

ΚΚ. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Για 6 καλλιέργειες χρειάζονται περίπου 15 ml φλεβικού αίματος. Πριν την αιμοληψία, ο δότης παραμένει για τουλάχιστον 8 ώρες νηστικός.

1. Γίνεται αιμοληψία 15 ml ολικού αίματος και αναμειγνύεται με 2 ml ηπαρίνης σε 50 ml σωλήνα.
2. Αραιώνεται με ακόμη 15 ml RPMI (Θρεπτικό υλικό που πήρε την ονομασία του από το Roswell Park Memorial Institute).
3. Επιστοιβάζεται το παραπάνω σε 15 ml παχύρρευστης φικόλης (ficoll rague, πυκνότητα 1,077 g/ml).
4. Φυγοκεντρείται στα 400 g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30 βαθμών Κελσίου χωρίς φρένο. (Στις περισσότερες φυγόκεντρους περίπου 1.600 rpm).
5. Αρχικά αφαιρείται μόνο η υπόλευκη στιβάδα που περιέχει τα μονοκύτταρα και τίποτε άλλο.
6. Στη συνέχεια αφαιρείται και ο ορός και τοποθετείται σε σωλήνα 15 ml για περαιτέρω επεξεργασία.
7. Η υπόλευκη στιβάδα τοποθετείται σε δύο νέο σωληνάρια 15 ml και καταλαμβάνει περίπου 3 ml σε κάθε σωληνάριο.
8. Αραιώνεται με 12 ml RPMI 1X.
9. Φυγοκεντρείται στα 300 g για 10 λεπτά στους 30 βαθμούς Κελσίου χωρίς φρένο. (Στις περισσότερες φυγόκεντρους περίπου 1.350 rpm).

10. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με ένα πουάρ σιγά σιγά. Αφήνεται το τελευταίο μιλιλίτρο το οποίο περιέχει τα κύτταρα.
11. Αραιώνεται με την προσθήκη 5 ml RPMI σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων, μετά από χρώση με trypan blue, και έλεγχος της βιωσιμότητάς τους στην πλάκα Neubauer. Συνήθως ανευρίσκονται περίπου $12 \cdot 10^6$ κύτταρα στο εναιώρημα. Η βιωσιμότητά τους είναι 99%. Κατανέμονται $2 \cdot 10^6$ κύτταρα ανά πηγαδάκι. Τα πηγαδάκια είναι 6 ανά τρυβλίο.
13. Προστίθεται και 1,5 ml RPMI θρεπτικό υλικό και αφήνονται τα κύτταρα να προσκολληθούν στον πλαστικό πυθμένα του τρυβλίου για 1+1/2 ώρα.
14. Στη συνέχεια ξεπλένονται τα υπερκείμενα κύτταρα με περίσσεια RPMI και αφαιρείται το υπερκείμενο.
15. Τα παραμένοντα κύτταρα στον πυθμένα των τρυβλίων είναι μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Παραμένουν και λίγα αιμοπετάλια.
16. Προστίθεται στην καλλιέργεια το ειδικό θρεπτικό υλικό και ξεκινά το πείραμα.

LL. Η επεξεργασία του ορού

1. Τοποθετείται ο ηπαρινισμένος ορός σε σωληνάριο 15 ml. (Ο όγκος του ορού είναι περίπου στα 5 ml).
2. Φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 24 βαθμούς Κελσίου στα 2.000 g. (Στις περισσότερες φυγόκεντρους στα 3.600 rpm).
3. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο ενώ το ίζημα απορρίπτεται.
4. Ο ορός διέρχεται μέσα από φίλτρο Surfactant-Free Cellulose Acetate (SFCA) με πόρους 0,20 μm και περνά σε νέο σωληνάριο.
5. Γίνεται επιβεβαίωση με το μικροσκόπιο ότι στη σύνθεση του ορού δεν υπάρχουν κύτταρα. Ο ορός μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να καταψυχθεί.

MM. Η ινσουλίνη που περιέχεται φυσιολογικά στον ορό αίματος των δοτών

Στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων προστίθεται 10% ορός αίματος του δότη. Επειδή ο ορός του αίματος περιέχει ινσουλίνη, είναι απαραίτητη η

ελαχιστοποίηση της ποσότητας αυτής για κάθε εθελοντή που συμμετείχε στη διατριβή. Για να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη αυτή η ποσότητα, οι εθελοντές δεν γευμάτισαν για τουλάχιστον 8 ώρες πριν τη στιγμή της αιμοληψίας. Η ποσότητα ινσουλίνης στο αίμα των εθελοντών είναι ελάχιστη, 0,78 μU/ml κατά μέσο όρο. Στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται 10% ορός, δηλαδή στις καλλιέργειες με όγκο 2 ml προστίθενται 200 μl ορού. Παρατηρούμε ότι η προστιθέμενη ποσότητα είναι πολύ μικρή, 0,16 μU κατά μέσο όρο. Γίνεται η παραδοχή ότι αυτή η ποσότητα δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της μελέτης.

ΝΝ. Καλλιέργεια των μονοκυρήνων

Ο όγκος του υπερκειμένου σε κάθε πηγάδι είναι 2 ml. Η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 100 mg/dl. Τα κύτταρα από έναν δότη έχουν θρεπτικό υλικό μόνο με ορό αίματος από τον ίδιο δότη. Γι' αυτό τον λόγο ο ορός θεωρείται «αυτόλογος».

1. Καλλιέργεια μονοκυρήνων με την παρουσία αυξητικών παραγόντων

(Α) Τα κύτταρα επωάζονται σε απο-διαφοροποιητικό θρεπτικό υλικό για επτά ημέρες. Το θρεπτικό υλικό αποτελείται από RPMI 1640, 2 mmol/l γλουταμίνη, M-CSF (παράγοντα ενεργοποίησης των αποικιών των Μεγάλων Μονοκυρήνων) (5 ng/ml), IL-3 (ανθρώπινη Ιντερλευκίνη-3) (1 ng/ml), penicillin (100 IU/ml), streptomycin 100 mg/ml, β-merkaptoethanol (10 μg/ml) και 10% ανθρώπινο αυτόλογο ορό αίματος. Το μισό θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε την τρίτη ημέρα.

(Β) Την έβδομη ημέρα, το θρεπτικό υλικό αλλάζει στο διαφοροποιητικό υλικό και τα κύτταρα καλλιεργούνται για ακόμη επτά ημέρες. Το θρεπτικό υλικό αποτελείται από RPMI 1640, 2 mmol/l γλουταμίνη, EGF (Epidermal Growth Factor) (10 ng/ml), HGF (Hepatocyte Growth Factor) (20 ng/ml), penicillin (100 IU/ml) και streptomycin (100 mg/ml), nicotinamide (1 mg/ml), liraglutide (1 μg/ml) και 10% ανθρώπινο αυτόλογο ορό αίματος. Το μισό θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε τη δέκατη ημέρα.

2. Καλλιέργεια μονοκυρήνων χωρίς αυξητικούς παράγοντες

Τα κύτταρα επωάζονται μόνο με RPMI και 10% αυτόλογο ορό αίματος για 14 ημέρες. Το μισό θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται κάθε τρεις ημέρες.

Η προμήθεια όλων των υλικών για τις καλλιέργειες έγινε από τη Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), εκτός από το RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) και τη liraglutide (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark).

ΟΟ. Ιστολογική χρώση κατά May Grunwald-Giemsa

1. Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού και αφήνεται το πηγάδι της καλλιέργειας να στεγνώσει καλά.
2. Στη συνέχεια με ένα πουάρ τοποθετείται χρωστική May-Grunwald για τρία λεπτά αναρραίωτη, τόση ποσότητα όση να καλυφθεί ο πυθμένας.
3. Γίνεται έκπλυση της χρωστικής με απεσταγμένο νερό.
4. Σε 5 ml νερό τοποθετούνται 15 σταγόνες χρωστικής Giemsa με ένα πουάρ ώστε να αραιωθεί η χρωστική.
5. Στη συνέχεια τοποθετείται στο πηγαδάκι σε τόση ποσότητα όσο να καλυφθεί ο πυθμένας.
6. Γίνεται έκπλυση της δεύτερης χρωστικής με απεσταγμένο νερό.
7. Αφήνονται τα πηγαδάκια να στεγνώσουν τελείως από το νερό.
8. Τα πηγαδάκια είναι έτοιμα για παρατήρηση και τα κύτταρα είναι πλέον μονιμοποιημένα.
9. Οι πυρήνες σε αυτή τη χρώση χρωματίζονται μωβ ή σκούρο μπλε και το κυτταρόπλασμα ροζ ή γαλάζιο. Τα ηωσινόφιλα κοκκία πορτοκαλί και τα βασεόφιλα κοκκία κόκκινα.

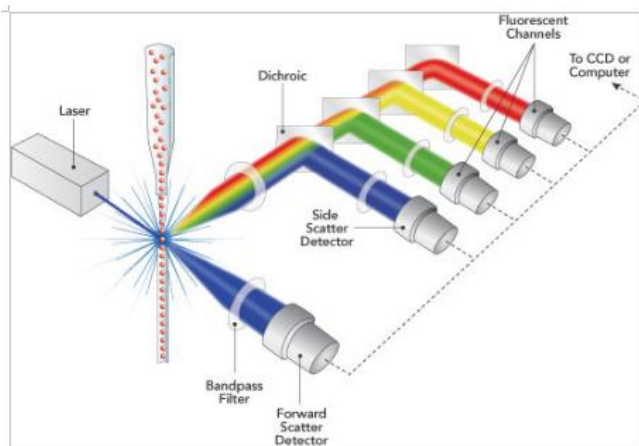
Η παρατήρηση του τρυβλίου έγινε σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Axio Observer inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

ΡΡ. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι μια τεχνική για τη μέτρηση και την εξέταση μικροσκοπικών σωματιδίων, όπως τα κύτταρα και τα χρωμοσώματα, όταν περνούν από μία πολύ λεπτή ροή ειδικού διαλύματος. Ανιχνεύονται από μια ηλεκτρονική συσκευή ανίχνευσης. Η τεχνική επιτρέπει την ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση των φυσικών ή/και χημικών χαρακτηριστικών εκατοντάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο.

Η κυτταρομετρία ροής έχει την ικανότητα να χαρακτηρίζει τα κύτταρα από τους υποδοχείς που φέρουν στην επιφάνειά τους. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται Δείκτες Διαφοροποίησης (Clusters of Differentiation – CD). Μια ακτίνα φωτός (συνήθως φως λέιζερ) συγκεκριμένου μήκους κύματος κατευθύνεται εστιασμένα στη ροή του υγρού που βρίσκονται τα κύτταρα. Κάθε σωματίδιο ή κύτταρο 0,2 έως 150 μικρόμετρα, που διέρχεται από την

ακτίνα laser, σκεδάζει το φως. Οι χημικές ουσίες που βρίσκονται στο σωματίδιο ή προσαρτώνται σε αυτό πριν την κυτταρομετρία, διεγείρονται και εκπέμπουν φως σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από την πηγή φωτός. Αυτός ο συνδυασμός διάχυσης και φθορισμού του φωτός μπορεί να διαβαστεί από τους ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές συλλέγουν φως από το σημείο όπου διέρχεται η φωτεινή δέσμη και αναλύουν τις διακυμάνσεις στη φωτεινότητα και στο μήκος κύματος.



Εικόνα 9. Η αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής. Η ακτίνα του φωτός Laser προσπίπτει πάνω στη στήλη των κυττάρων. Το φως διαθλάται σε επιμέρους χρώματα (μπλε, πράσινο, κίτρινο και κόκκινο) και συλλέγεται από τους αντίστοιχους ειδικούς συλλέκτες. (150)

Επιλέχθηκαν οι παρακάτω έξι δείκτες διαφοροποίησης [Clusters of Differentiation (CDs)] επειδή είναι χαρακτηριστικοί για 6 τύπους κυττάρων (Πίνακας 2):

(α) Ο δείκτης CD45 χρησιμεύει στη σήμανση των λευκών αιμοσφαιρίων και στον διαχωρισμό τους από τα κυτταρικά υπολείμματα της καλλιέργειας.

(β) Ο δείκτης CD14 χρησιμεύει για τον διαχωρισμό των μονοκυττάρων από τα λεμφοκύτταρα.

(γ) Ο δείκτης CD16 προκύπτει στην επιφάνεια των μονοκυττάρων κατά τη διαφοροποίησή τους προς μακροφάγα. Επομένως είναι δείκτης ωρίμανσης.

(δ) Ο δείκτης CD209 είναι δείκτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των

δενδριτικών κυττάρων που προκύπτουν από την ωρίμανση των μονοκυττάρων. Επομένως αποτελεί δείκτη ωρίμανσης.

(ε) Ο δείκτης CD33 υπάρχει στην επιφάνεια προγονικών κυττάρων των μονοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται CFU-Monocytes (Colony Forming Unit-Monocytes), δηλαδή κύτταρα τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν μια αποικία μονοκυττάρων. Είναι δείκτης αωρότητας.

(στ) Ο δείκτης CD34 βρίσκεται σε ακόμη πιο άωρα κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να παράγουν αποικίες και των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων. Είναι επίσης δείκτης αωρότητας.

Πίνακας 2. CD υποδοχείς που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρομετρία	
Δείκτες διαφοροποίησης	Χαρακτηριστικός υποδοχέας
CD45	Όλα τα λευκά αιμοσφαίρια
CD14	Μονοκύτταρα
CD16	Μακροφάγα
CD33	Colony Forming Unit- Μονοκύτταρα
CD34	Colony Forming Unit-Κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα
CD209	Dendritic cells

1. Διαδικασία προετοιμασίας κυττάρων για κυτταρομετρία

1. Τα κύτταρα προς εξέταση αποκολλώνται από τα πηγαδάκια με απόξεση (cell scraping).
2. Φυγοκεντρώνονται στα 400 g για 10 λεπτά.
3. Το ίζημα των κυττάρων (πέλετ) διαλύεται σε δύο ml RPMI.
4. Στη συνέχεια 500 μl εναιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό υλικό RPMI μεταφέρονται για κυτταρομετρία. Περίπου 100.000 κύτταρα περιέχονται στο εναιώρημα.
5. Τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάρια για κυτταρομετρία.
6. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα κατάλληλα αντισώματα σε ποσότητα 10 μl ανά αντίσωμα.
7. Γίνεται ανακίνηση με ελαφρύ vortex ώστε να αναμειχθούν τα συστατικά.
8. Επωάζονται για 15-20 λεπτά.
9. Στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

Για τις ανάγκες της διατριβής χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο της Beckman Coulter, μοντέλο Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Milan, Italy), που βρίσκεται στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, κατόπιν σχετικής άδειας από τη διοίκηση του νοσοκομείου. Κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα στην πρώτη, έβδομη και 14^η μέρα της καλλιέργειας. Όλα τα CD αντισώματα αποκτήθηκαν από την Exbio (Prague, Czech Republic), εκτός από το CD209 (Biolegend, San Diego, USA). Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το freeware "Flowing Software" version 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland).

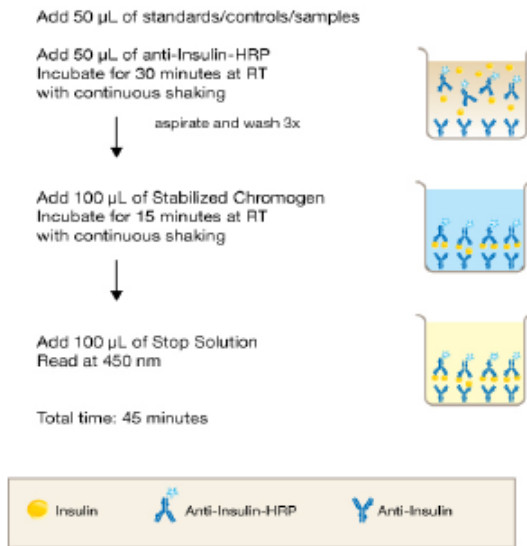
QQ. Τεχνική της ELISA

Η ένζυμο-συνδεμένη ανοσοπροσοφορική αντίδραση (ELISA) είναι μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για να ανιχνεύσει την παρουσία ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και την παθολογία των φυτών, καθώς και για τον ποιοτικό έλεγχο σε διάφορες βιομηχανίες.

Η αρχή της μεθόδου είναι η εξής: Ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου έχει τοποθετηθεί πάνω σε μια επιφάνεια και στη συνέχεια ένα συγκεκριμένο αντισώμα εφαρμόζεται πάνω από την επιφάνεια ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Το αντίσωμα συνδέεται στη συνέχεια με ένα ένζυμο, το οποίο μπορεί να μεταδώσει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, πιο συχνά με την αλλαγή χρώματος του χημικού υποστρώματος.

Το δείγμα με ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου είναι ακινητοποιημένο σε μια στερεά επιφάνεια (συνήθως πλάκα πολυστερίνης) είτε μη ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) είτε ειδικά (μέσω της σύλληψης από ένα άλλο αντισώμα συγκεκριμένο για το ίδιο αντιγόνο, σε μία «σάντουιτς» ELISA). Αφού το αντιγόνο ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια, το αντισώμα ανίχνευσης προστίθεται, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο. Ανάμεσα σε κάθε βήμα, η πλάκα συνήθως πλένεται με ένα ήπιο απορρυπαντικό για την απομάκρυνση τυχόν πρωτεϊνών ή αντισωμάτων που δεν είναι συνδεδεμένα. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, στην πλάκα προστίθεται ένα ένζυμο που παράγει ένα ορατό σήμα, το οποίο δείχνει την ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα.

Human Insulin Assay Summary



Εικόνα 10. Η αρχή της τεχνικής της ELISA σύμφωνα με το Human Insulin ELISA kit manual KAQ 1251, Invitrogen.

1. Πρωτόκολλο της ELISA

1. Όλα τα αντιδραστήρια φτάνουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
2. Αραιώνονται τα στάνταρ και τα κοντρόλ και δημιουργείται το τυφλό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στα πηγαδάκια. Ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων, από 50 μl σε κάθε πηγαδάκι.
4. Προστίθεται αντι-ορός ινσουλίνης από 50 μl σε κάθε πηγαδάκι και ακολουθεί χρόνος επώασης.
5. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται χρωμογόνο από 100 μl σε κάθε πηγαδάκι. Ακολουθεί δεύτερο στάδιο επώασης.
6. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται διάλυμα που σταματά τις χημικές αντιδράσεις από 100 μl σε κάθε πηγαδάκι.
7. Γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα φωτομέτρηση στα 450 νανόμετρα.
8. Κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη από τις απορροφήσεις των στάνταρ. Η καμπύλη γίνεται με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel. Η καμπύλη αντιστοιχεί σε πολυωνυμική εξίσωση τρίτου βαθμού.
9. Ελέγχεται η ορθότητά της με τις τιμές της ομάδας ελέγχου που έχουν γνωστή συγκέντρωση και συμπεριλαμβάνονται στο κιτ μέτρησης.
10. Στη συνέχεια προβάλλονται στην καμπύλη οι φωτομετρήσεις των δειγμάτων και έτσι γίνεται υπολογισμός της συγκέντρωσης της ινσουλίνης που περιέχουν.

Τα δείγματα στην παρούσα διατριβή είναι τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών την πρώτη, έβδομη και 14η ημέρα καλλιέργειας. Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται δείγμα 50 μl σε συγκέντρωση γλυκόζης 100 mg/dl. Το υπόλοιπο υπερκείμενο διατηρείται. Στη συνέχεια γίνεται αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με εξωγενή προσθήκη (όγκος 50 μl), ώστε η συγκέντρωση μέσα στα πηγαδάκια να ανεβεί από 100 mg/dl στην τελική τιμή 250 mg/dl. Έτσι, ο όγκος του υπερκείμενου στα πηγαδάκια παραμένει σταθερός στα 2 ml. Μετά από μίας ώρας επώαση στα 250 mg/dl γλυκόζη, το υπερκείμενο συλλέγεται ολόκληρο και καταψύχεται στη βαθιά κατάψυξη (-75° C). Τα επίπεδα της ινσουλίνης μετρήθηκαν με το κιτ Human Insulin ELISA KAQ1251 της εταιρείας Invitrogen (Paisley, United Kingdom) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

RR. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι ένα είδος μικροσκοπίου που χρησιμοποιεί μια δέσμη ηλεκτρονίων για να φωτίζει το δείγμα και για να παράγουν μια μεγεθυμένη εικόνα. Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια (Electron Microscope) έχουν μεγαλύτερη δύναμη μεγέθυνσης από το οπτικό μικροσκόπιο, επειδή τα ηλεκτρόνια έχουν μήκη κύματος περίπου 100.000 φορές μικρότερα από το ορατό φως (φωτόνια) και μπορούν να επιτύχουν καλύτερα από 0,2 nm εικονοστοιχεία και μεγεθύνσεις έως και 2.000.000x. Στα μικροσκόπια που βασίζονται στο φως περιορίζονται από την περίθλαση σε περίπου 200 nm εικονοστοιχεία και μεγεθύνσεις έως 2.000x.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί ηλεκτροστατικούς και ηλεκτρομαγνητικούς «φακούς» για τον έλεγχο της δέσμης ηλεκτρονίων και την εστίαση, ώστε να σχηματίσει μια εικόνα. Αυτοί οι φακοί είναι ανάλογοι αλλά διαφορετικοί από τους φακούς από γυαλί του οπτικού μικροσκοπίου που σχηματίζουν μια μεγεθυμένη εικόνα, εστιάζοντας στο φως πάνω ή μέσα από το δείγμα.

Για τη μετάδοση της εικόνας με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η δέσμη ηλεκτρονίων πρώτα σκεδάζεται από το δείγμα και, στη συνέχεια, οι φακοί του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εκ νέου εστιάζουν τη δέσμη σε μία εικόνα, που χρησιμοποιεί μετασχηματισμούς τύπου Fourier για να σχηματιστεί από την περίθλαση της επιλεγμένης περιοχής. Η πραγματική εικόνα που σχηματίζεται μεγεθύνεται με συντελεστή που κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες σε πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φορές. Στη συνέχεια προβάλλεται στην οθόνη και μπορεί να αποθηκευθεί σε ψηφιακά μέσα. Τα μικροσκόπια ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση ευρέος φάσματος βιολογικών και ανόργανων δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών, των κυττάρων, των μακρομορίων, βιοψιών δειγμάτων, των μετάλλων και κρυστάλλων.

Το μείζον μειονέκτημα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι η ανάγκη για εξαιρετικά λεπτές τομές των δειγμάτων, συνήθως λιγότερο από 100 νανόμετρα. Τα βιολογικά δείγματα για να είναι χημικά σταθερά απαιτούν αφυδάτωση και ένταξη σε πολυμερή ρητίνης, με σκοπό τη σταθεροποίησή τους, ώστε να επιτρέψουν τη δημιουργία υπέρλεπτων τομών. Τμήματα των βιολογικών δειγμάτων, τα οργανικά πολυμερή και παρόμοια υλικά απαιτούν ειδική χρώση με βαρέα μέταλλα, προκειμένου να επιτευχθεί η απαιτούμενη αντίθεση της εικόνας.

1. Πρωτόκολλο επεξεργασίας δείγματος για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

1. Γίνεται αποκόλληση των κυττάρων από το πηγαδάκι της καλλιέργειας με τη βοήθεια του ξέστρου (cell scraper) και φυγοκέντρηση του υπερκειμένου.

2. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε erpendorf σωληνάρια 15 ml, προστίθεται λίγο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1.800 στροφές για 15 λεπτά στους 25 βαθμούς Κελσίου.
3. Τα κύτταρα που συσσωρεύονται στο πέλετ εναιωρούνται σε 1 ml γλουταραλδεΐδης.
4. Επώάζονται 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση με σιφώνιο (πιπέτα) της γλουταραλδεΐδης.
6. Έκπλυση με PBS (Phosphate Buffer Saline).
7. Μονιμοποίηση σε διάλυμα οσμίου 2% για μία ώρα σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου.
8. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.500 στροφές για να αφαιρεθεί το όσμιο.
9. Έκπλυση με PBS και δις αποσταγμένο νερό.
10. Τοποθέτηση του εναιωρήματος σε υδατικό διάλυμα 1% οξικού ουρανιλίου όλη τη νύχτα.
11. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
12. Αφυδάτωση σε διαλύματα αλκοόλης: 30% για 5 λεπτά, 50% για 5 λεπτά, 70% για 5 λεπτά, 90% για 5 λεπτά, 100% για 5 λεπτά έξι φορές.
13. Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη ίσων όγκων απόλυτης αλκοόλης και εποξειδικής ρητίνης EPON και επώαση για 5 λεπτά.
14. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.500 στροφές.
15. Εγκλεισμός του ιζήματος των κυττάρων σε εποξειδική ρητίνη EPON παρουσία καταλύτη σε κλίβανο 70 βαθμών Κελσίου για 24 ώρες.
16. Η ρητίνη κόβεται σε ειδικό μικροτόμο.
17. Αρχικά οι τομές της ρητίνης είναι 1-2 μικρόμετρα.
18. Στη συνέχεια γίνονται δεύτερες τομές 30-50 νανόμετρα.
19. Οι τομές τοποθετούνται σε χάλκινα πλέγματα και χρωματίζονται με διάλυμα κιτρικού μολύβδου.

Η προετοιμασία των δειγμάτων και η απεικόνιση της μικροσκοπικής δομής των διαφοροποιημένων κυττάρων της μονοκυτταρικής σειράς έγινε στο εργαστήριο της Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ.

SS. Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πρόγραμμα software SPSS version 21 (IBM corporation, New York, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αρχικά, οι ομάδες των αποτελεσμάτων της ELISA ελέγχθηκαν για κανονικότητα. Επειδή κάθε ομάδα περιέχει λιγότερες από 50 τιμές-μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκε το τεστ Shapiro-Wilk. Η Ομάδα 3 συγκρίθηκε με μη παραμετρικά τεστ επειδή δεν έχει κανονική κατανομή ($p=0.012$). Οι υπόλοιπες ομάδες συγκρίθηκαν με παραμετρικά τεστ, επειδή έχουν κανονική κατανομή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε για $p<0.05$.

ΠΤ. Έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης

Αγαπητέ Κύριε / Αγαπητή Κυρία,

Θα θέλαμε να σας καλέσουμε να πάρετε μέρος στη διδακτορική διατριβή με τίτλο «In vitro μελέτη της ικανότητας διαφοροποίησης των Μεγάλων Μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη». Αυτή η διατριβή έχει ως στόχο να βοηθήσει τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη.

Από τη μεριά σας, θα χρειαστεί να πάρουμε 20 ml περίπου φλεβικό αίμα με μια απλή αιμοληψία. Στη συνέχεια θα επεξεργαστούμε το αίμα κατάλληλα ώστε να απομονώσουμε τα λευκά αιμοσφαίρια. Ακολούθως θα τα καλλιεργήσουμε στο εργαστήριο και θα προσπαθήσουμε να παραγάγουμε ινσουλίνη από αυτά.

Οι κίνδυνοι της δειγματοληψίας είναι ίδιοι με τους κινδύνους που έχει μια απλή φλεβοκέντηση. Μπορεί να υπάρχει τοπική φλεγμονή, μικρή αιμορραγία ή και κάκωση της φλέβας με αποτέλεσμα τη θρόμβωσή της. Θα ληφθούν όλα τα απαραίτητα μέτρα ώστε να προληφθούν οι παραπάνω καταστάσεις. Η αιμοληψία θα γίνει από έμπειρο προσωπικό, θα γίνει επαρκής αντισηψία στο σημείο της φλεβοκέντησης και θα πιεστεί η φλέβα ώστε να μην αιμορραγεί. Η δειγματοληψία θα γίνει από τις φλέβες του πήχην ή του βραχίονα.

Θα πραγματοποιηθεί μία γενική εξέταση αίματος. Αν διαπιστωθεί αιματοκρίτης κάτω από 35 ή κάποια άλλη παθολογική κατάσταση, δεν θα συμμετέχετε στη μελέτη και θα σας δίνονται οδηγίες για την υγεία σας. Τα κύτταρα μετά το τέλος της μελέτης θα απορρίπτονται κατάλληλα και δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πειράματα. Δεν πρόκειται να εμφανιστεί το όνομά σας ή άλλα προσωπικά δεδομένα στη διατριβή. Τα προσωπικά στοιχεία σας είναι απόρρητα. Αν συμφωνείτε με τα παραπάνω και θέλετε να συμμετέχετε στη διατριβή, παρακαλώ πολύ να δώσετε τη συγκατάθεσή σας παρακάτω.

Ναι, επιθυμώ να συμμετέχω στη διδακτορική διατριβή με τίτλο «In vitro μελέτη της ικανότητας διαφοροποίησης των Μεγάλων Μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη».

Θεσσαλονίκη

Ο / Η υπογεγραμμένος / η

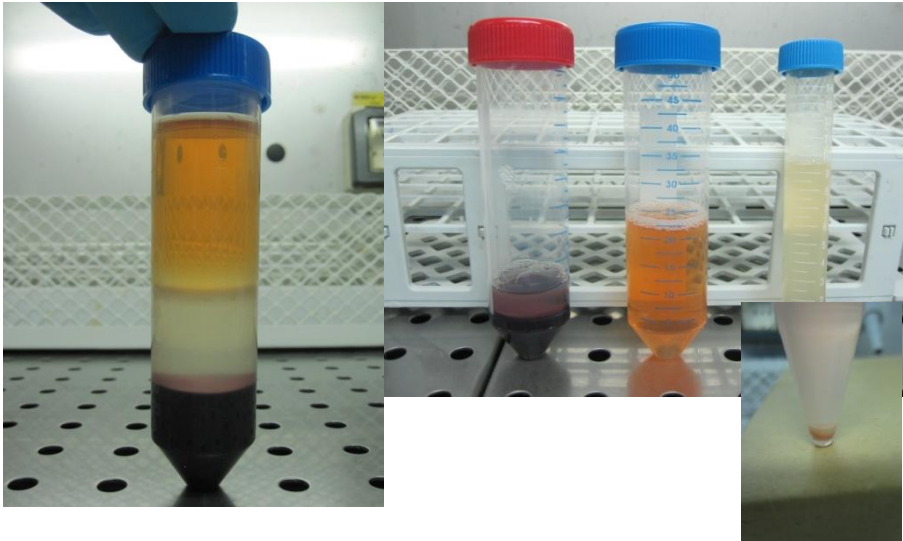
Υπογραφή

XVII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

XVIII. ΕΝΑΡΞΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

UU. Απομόνωση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα

Μετά τη φυγοκέντρηση του ολικού αίματος πάνω από τη σιβάδα της φικόλης παίρνουμε τον εξής διαχωρισμό: η κίτρινη σιβάδα κάτω από το μπλε πώμα αποτελείται από τον ορό του αίματος, η υπόλευκη σκούρη σιβάδα ακριβώς παρακάτω περιέχει τα μονοπύρρηνα κύτταρα, η λευκή σιβάδα παρακάτω περιέχει τη φικόλη και τα ουδετερόφιλα, η ερυθρά σιβάδα στο τέλος περιέχει τα ερυθρά αιμοσφαίρια.



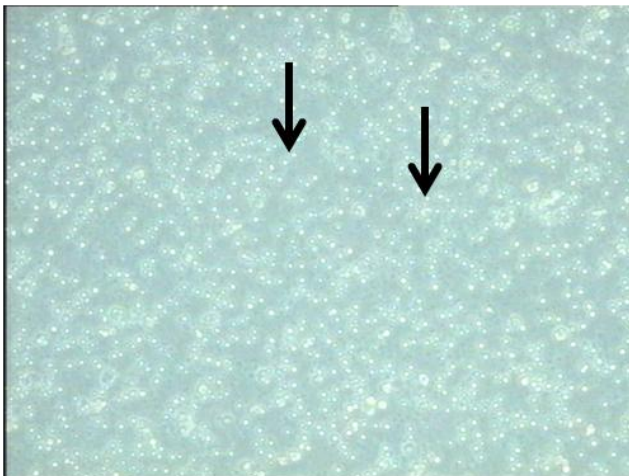
Εικόνα 11. (αριστερά) Οι σιβάδες του αίματος μετά την πρώτη φυγοκέντρηση με φικόλη. Μεταξύ της κίτρινης και της άσπρης σιβάδας, ξεχωρίζει η υπόλευκη σιβάδα με τα μονοπύρρηνα. (κέντρο) Με μία πιπέτα αφαιρούμε σταδιακά τις σιβάδες και τις ταξινομούμε σε μικρότερα σωληνάκια. (δεξιά) Γίνεται φυγοκέντρηση της υπόλευκης σιβάδας και σχηματίζεται στη μύτη του σωληναρίου ίζημα από τα μονοπύρρηνα.

Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αραιώνουμε με θρεπτικό υλικό και διαλύουμε το ίζημα με απαλές κινήσεις με τη βοήθεια ενός πουάρ. Είμαστε έτοιμοι να ξεκινήσουμε τις καλλιέργειες στα ειδικά τρυβλία.



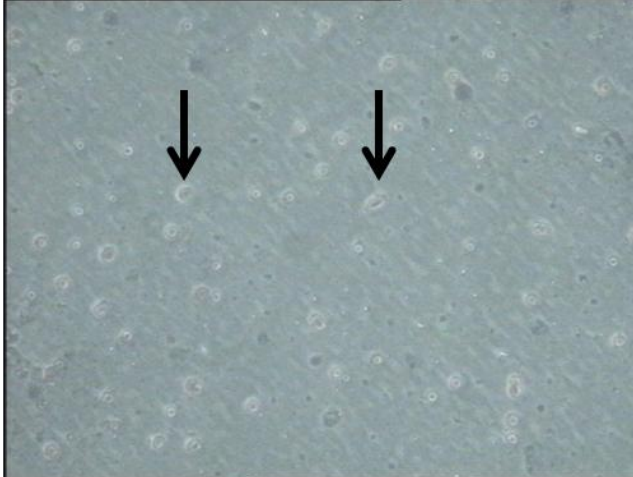
Εικόνα 12. Ενδεικτικά φωτογραφίζεται ένα τρυβλίο με έξι πηγαδάκια. Αυτό το είδος τρυβλίου χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα.

VV. Μελέτη των κυττάρων αμέσως μετά την απομόνωση με το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο



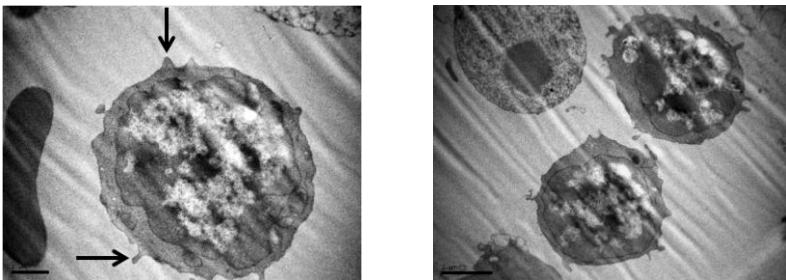
Εικόνα 13. Η φωτογραφία έχει ληφθεί αμέσως μετά την απομόνωση των κυττάρων από το περιφερικό αίμα. Παρατηρούμε κατά την απομόνωση των κυττάρων ότι είναι μικρά, στρογγυλά, δεν ξεχωρίζει ο πυρήνας τους και υπάρχει σχετική ομοιομορφία. Δεν υπάρχουν κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Τα κύτταρα αιωρούνται και δεν είναι κολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου. Η μεγέθυνση είναι **20x**.

WW. Ιστολογικές χρώσεις απλών μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων αμέσως μετά την απομόνωσή τους από το περιφερικό αίμα



Εικόνα 14. Τα κύτταρα κατά την απομόνωσή τους είναι μικρά και στρογγυλά. Ο πυρήνας είναι μικρός και βρίσκεται στο κέντρο του κυττάρου. Δεν υπάρχουν συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Ορισμένα κύτταρα γίνονται ελλειπτικά, διότι αρχίζει ο σχηματισμός των ψευδοποδίων για καλύτερη προσκόλληση στην επιφάνεια. Η μεγέθυνση των κυττάρων είναι της τάξης του 20x.

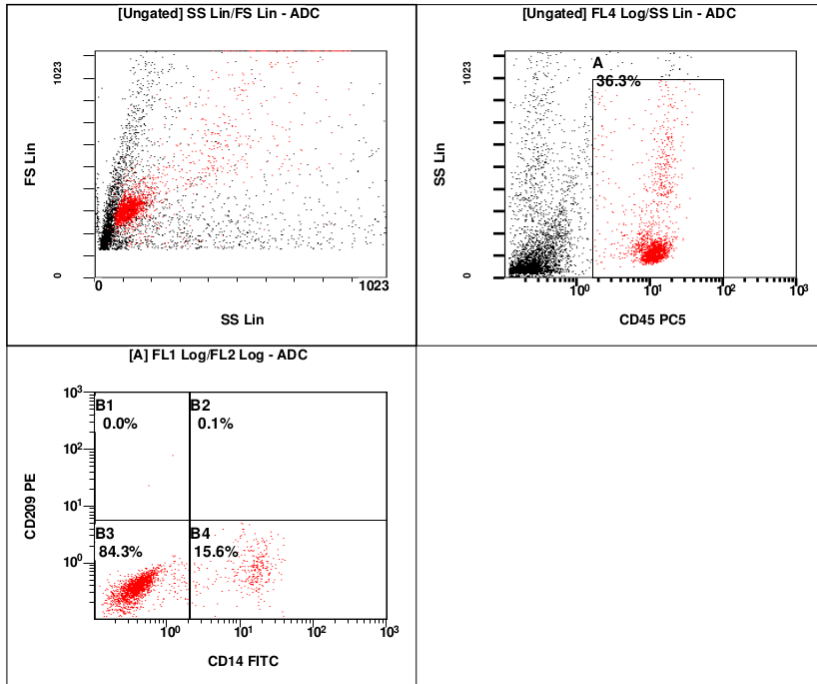
XX. Μελέτη των κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



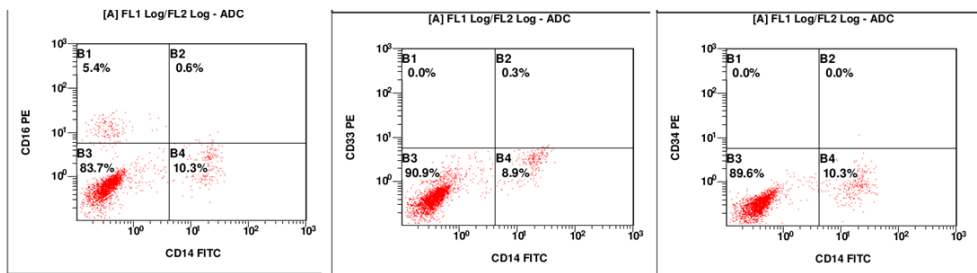
Εικόνα 15. Κύτταρα της καλλιέργειας αμέσως μετά την απομόνωση από το περιφερικό αίμα. Παρατηρούμε ότι κατά την έναρξη των πειραμάτων τα κύτταρα είναι στρογγυλά με τον πυρήνα στο κέντρο, έχουν τυπική

μορφολογία μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων και δεν έχουν συνδέσεις μεταξύ τους. Φαίνονται μικρά ψευδοπόδια που αρχίζουν να αναπτύσσονται. Η μεγέθυνση είναι στην αριστερή εικόνα 15.000x και στη δεξιά 10.000x.

ΥΥ. Κυτταρομετρία αμέσως μετά την απομόνωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων



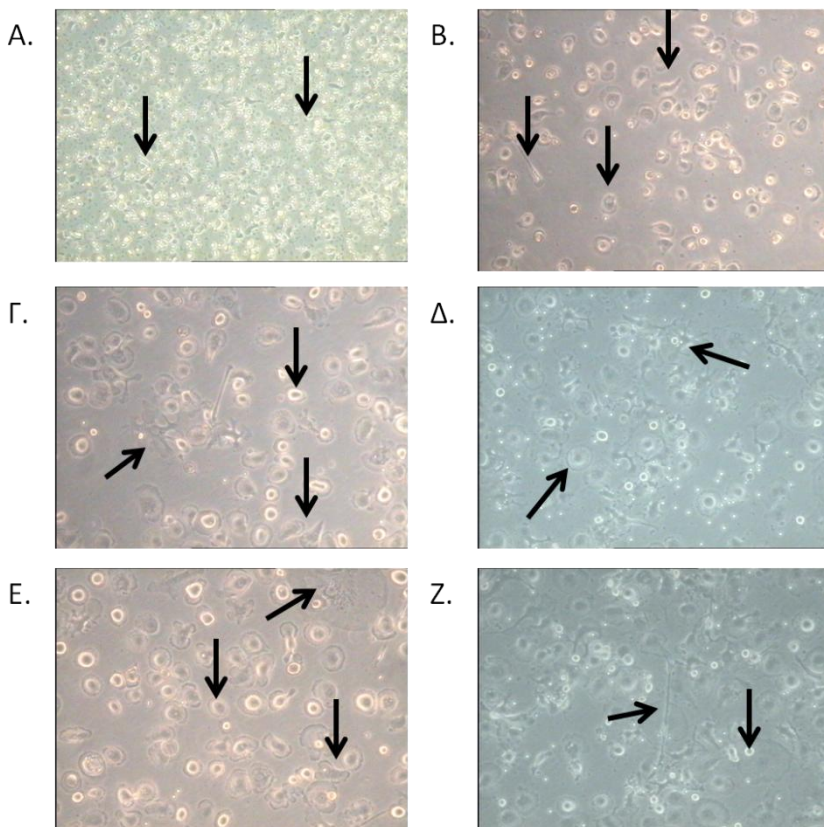
Εικόνα 16. Όπως παρατηρούμε στην περιοχή A ξεχωρίζουμε τα λευκά αιμοσφαίρια από τα κυτταρικά υπολείμματα με το αντίσωμα CD45, το οποίο είναι ειδικό για τα λευκά αιμοσφαίρια. Στη συνέχεια προστίθενται δύο φθορίζοντα αντισώματα: το CD14, το οποίο είναι ειδικό για τα μονοκύτταρα, και το CD209, το οποίο είναι ειδικό για τα δενδριτικά κύτταρα. Στην περιοχή B4 παρατηρούμε ότι στο σύνολο των κυττάρων το 15,6% είναι μονοκύτταρα (εκφράζει το CD14). Στην περιοχή B1 παρατηρούμε ότι στο σύνολο των κυττάρων κανένα δεν είναι δενδριτικό (δεν εκφράζεται το CD 209).



Εικόνα 17. Επίσης παρατηρούμε ξανά ότι στην περιοχή B1 υπάρχουν 5,4% κύτταρα που εκφράζουν τον δείκτη CD16 και αντιστοιχούν στα Natural Killer Cells. Στην περιοχή B1 παρατηρούμε ότι κανένα κύτταρο δεν εκφράζει τον δείκτη CD33, ο οποίος αντιστοιχεί σε αωρότερες μορφές των μονοκυττάρων. Επίσης στην περιοχή B1 δεν εκφράζεται ο δείκτης CD34, ο οποίος αντιστοιχεί και αυτός σε αωρότερες μορφές κυττάρων. Τα παραπάνω είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

ΧΙΧ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

ΖΖ. Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο σε συνάρτηση με την ημέρα καλλιέργειας



Εικόνα 18. Α. Τρίτη ημέρα καλλιέργειας. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν χάσει το στρογγυλό τους σχήμα και εμφανίζουν προεκβολές – ψευδοπόδια. Χάνεται η ομοιομορφία των κυττάρων. Στα κύτταρα αρχίζει να φαίνεται ο πυρήνας και σχηματίζονται ελαφρώς οι πρώτες μικρές συνδέσεις μεταξύ τους. Αρκετά κύτταρα έχουν αποπέσει και αυτό φαίνεται από τα σκούρα συσσωματώματα ανάμεσά τους.

Β. Έβδομη ημέρα καλλιέργειας. Τα κύτταρα έχουν σαφώς μεγαλώσει σε

μέγεθος και αντίστοιχα έχουν μεγαλώσει και οι συνδέσεις μεταξύ τους. Τα κύτταρα πλέον έχουν διαμορφώσει το καθένα το δικό του ξεχωριστό σχήμα. Οι πυρήνες τους είναι πλέον ευδιάκριτοι.

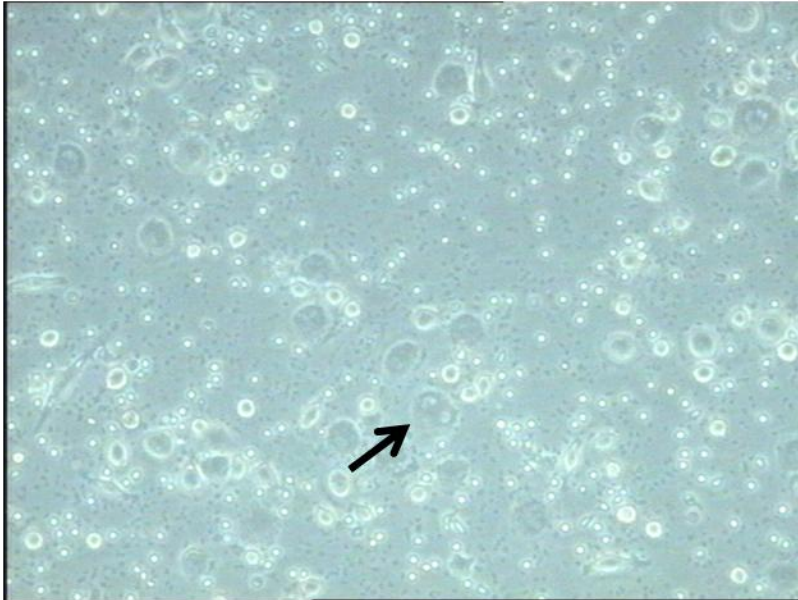
Γ. Ενδέκατη ημέρα καλλιέργειας. Τα κύτταρα αυξάνονται ακόμη περισσότερο σε μέγεθος και οι πυρήνες γίνονται έντονοι. Παρατηρούνται κυκλικά κύτταρα, επιμήκη και τριγωνικά. Ξεχωρίζουν δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα. Τα κύτταρα πλέον όχι μόνο συνδέονται μεταξύ τους, αλλά το ένα περιβάλλει το άλλο. Η προσκόλληση στα πλαστικά του τρυβλίου είναι ισχυρότατη.

Δ. Οι πυρήνες είναι μεγάλοι και η χρωματίνη ξετυλίγεται. Η διαφορά μεταξύ του λαμπερού και σκούρου κυτταροπλάσματος δείχνει και τη διαφορετική λειτουργία των κυττάρων. Ό,τι γράφτηκε για την 11η ημέρα ισχύει και για τη 14η ημέρα. Σε αυτή τη φωτογραφία υπάρχουν περισσότερα κύτταρα που μοιάζουν με δενδριτικά. Άλλα κύτταρα μοιάζουν με μακροφάγα και υπάρχουν και κύτταρα με ελλειπτικό σχήμα.

Ε. Είναι αξιοσημείωτο ότι ακόμη και τώρα υπάρχουν μερικά κύτταρα (λεμφοκύτταρα) τα οποία έχουν μείνει όπως ήταν από τη μέρα της απομόνωσης και έρχονται σε μεγάλη συνάφεια με τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Υπάρχουν συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων αλλά το πιο εντυπωσιακό είναι ότι πλέον το μακροφάγο περικλείει ένα ολόκληρο κύτταρο μέσα του και έχει καταλάβει εντυπωσιακό εμβαδό στην άνω δεξιά γωνία.

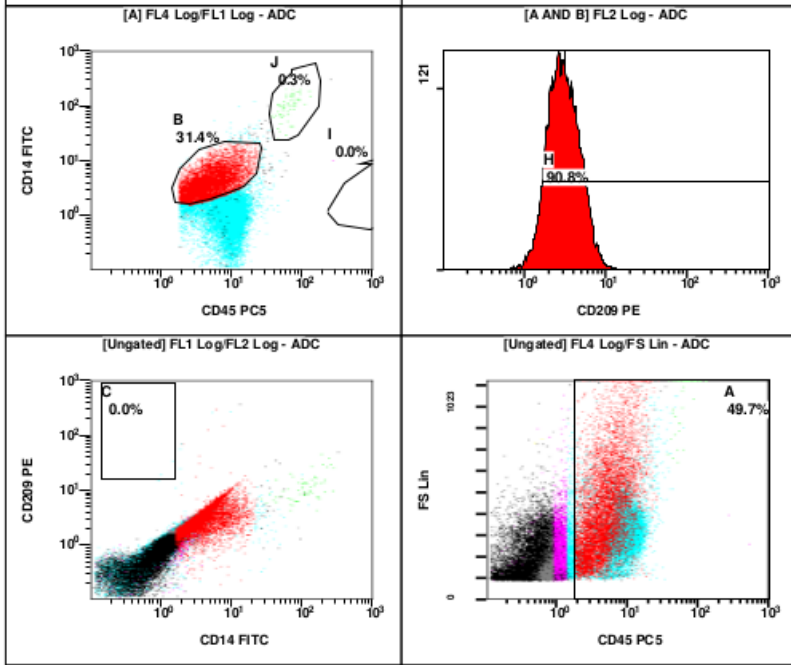
Ζ. Είναι εντυπωσιακή η αποφυάδα του κυττάρου που ενώνει πολύ μακρινές περιοχές του πηγαδιού. Το κύτταρο συμπεριφέρεται ως κύτταρο που μεταφέρει ερεθίσματα. Είναι εξίσου εντυπωσιακό ότι η αποφυάδα του ταξιδεύει πάνω από τα υπόλοιπα κύτταρα, τα οποία την υποστηρίζουν. Επίσης είναι πολύ εντυπωσιακό το γεγονός ότι τα μικρότερα κύτταρα με το λαμπερό κυτταρόπλασμα κάθονται κυριολεκτικά πάνω στα πλατιά κύτταρα τύπου μακροφάγου. Η δομή και η οργάνωση που αναπτύσσεται θυμίζει πλέον ιστό.

ΑΑΑ. Κύτταρα με διπλό πυρήνα

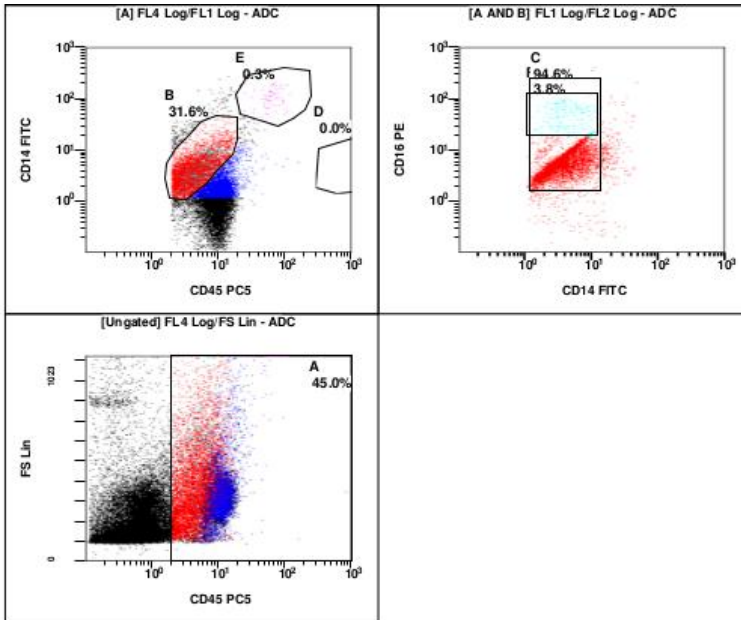


Εικόνα 19. Καλλιέργεια μετά από 14 ημέρες με την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Στο κέντρο της εικόνας παρατηρούμε ένα κύτταρο με δύο πυρήνια (μαύρο βέλος), το οποίο μοιάζει μορφολογικά με κύτταρο Sternberg – Reed, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για το Hodgkin λέμφωμα. Αυτό δείχνει ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων με την παρουσία αυξητικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε κύτταρα μορφολογικά ύποπτα για ασθένειες.

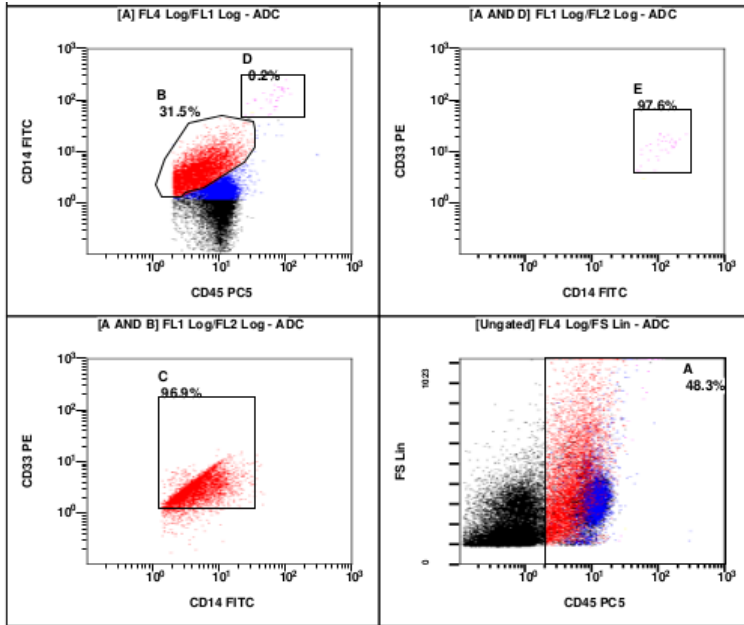
BBB. Κυτταρομετρία την 7η ημέρα καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες



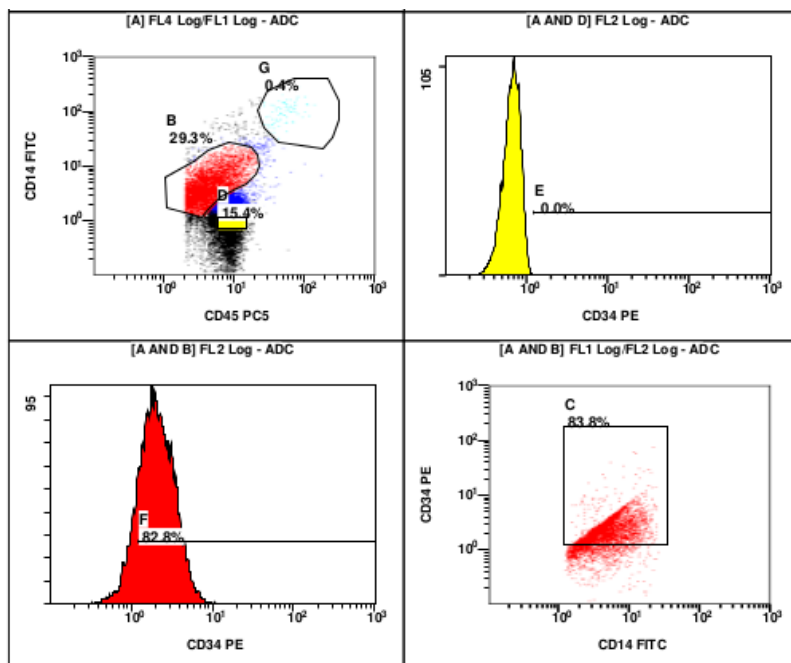
Εικόνα 20. Στην περιοχή B παρατηρούμε ότι το ποσοστό των μονοκυττάρων της καλλιέργειας, που υπολογίζεται από τον δείκτη CD14, έχει αυξηθεί πάνω από 31,4%. Σε αυτά τα κύτταρα, ο δείκτης H αποκαλύπτει ότι πάνω από 90,8% εκφράζουν πλέον τον δείκτη CD209, που αντιστοιχεί στα δενδριτικά κύτταρα. Επίσης, όσο πιο έντονα εκφράζουν τα κύτταρα τον δείκτη CD14, τόσο πιο έντονα εκφράζουν και τον δείκτη CD209, όπως φαίνεται από την περιοχή J και το πράσινο χρώμα των κυττάρων.



Εικόνα 21. Στην περιοχή Β απεικονίζονται τα μονοκύτταρα. Στην περιοχή C απεικονίζεται η έκφραση του δείκτη CD16 στα μονοκύτταρα. Παρατηρούμε ότι 3,8% των μονοκυττάρων εκφράζει τον δείκτη CD16 σε υψηλό ποσοστό, ενώ 94,6% των μονοκυττάρων εκφράζουν τον δείκτη σε χαμηλό ποσοστό.

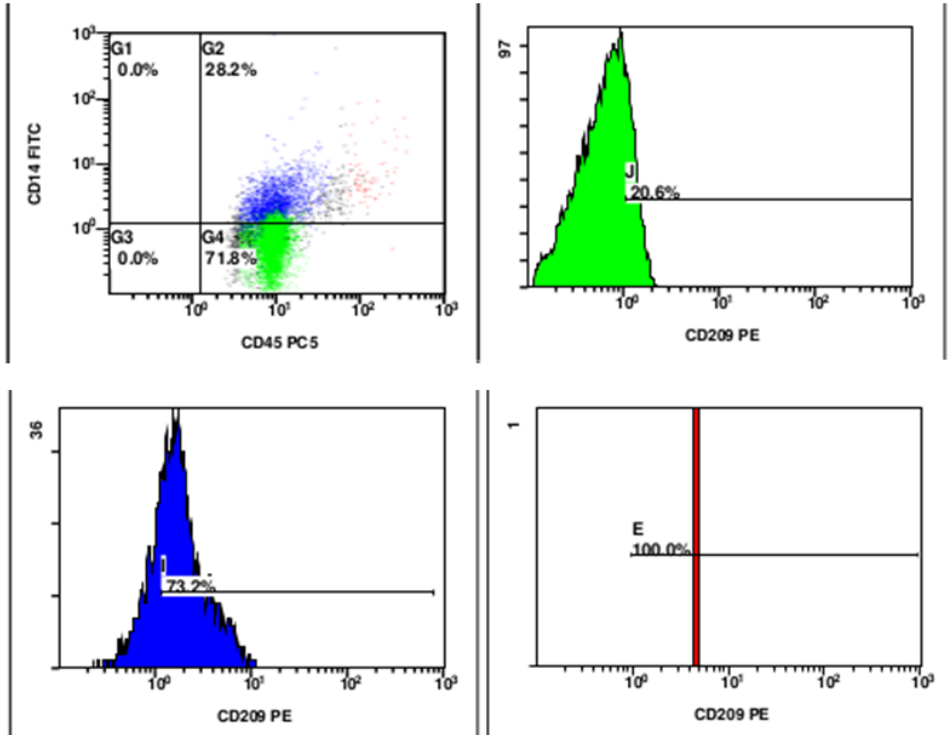


Εικόνα 22. Παρατηρούμε ότι τα μονοκύτταρα βρίσκονται στην περιοχή B. Το 96,9% των μονοκυττάρων έχει έκφραση του δείκτη CD33 (περιοχή C), έστω και σε χαμηλό βαθμό. Όταν όμως ο δείκτης CD14 εκφράζεται με υψηλό εκθέτη (περιοχή D), σε εξίσου μεγάλο εκθέτη εκφράζεται και ο δείκτης CD33 (περιοχή E).

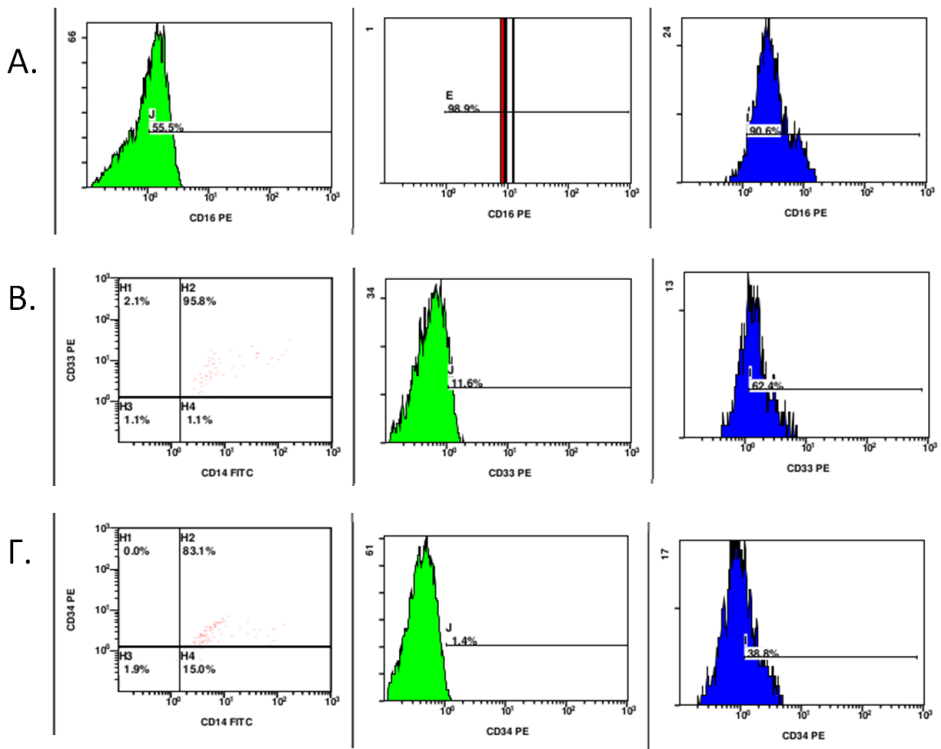


Εικόνα 23. Παρατηρούμε ότι τα μονοκύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή B εκφράζουν τον δείκτη CD34 σε ποσοστό 82,8% (γραμμή F), σε χαμηλό εκθέτη. Αντίθετα τα λεμφοκύτταρα, που απεικονίζονται με κίτρινο χρώμα, δεν εκφράζουν καθόλου τον παραπάνω δείκτη (γραμμή E).

CCC. Κυτταρομετρία τη 14η ημέρα καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες



Εικόνα 24. Τη 14η ημέρα της καλλιέργειας των μονοπυρήνων, μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα κύτταρα σε τρεις πληθυσμούς. Τα μονοκύτταρα με χαμηλό εκθέτη έκφρασης του δείκτη CD14 (μπλε χρώμα), τα μονοκύτταρα με υψηλό εκθέτη έκφρασης του CD14 (κόκκινο χρώμα), και στα λεμφοκύτταρα που δεν εκφράζουν τον παραπάνω δείκτη (πράσινο χρώμα) CD 209. Παρατηρούμε ότι το ποσοστό των μονοκυττάρων είναι περίπου 28,2%, όπως φαίνεται στην περιοχή G2. Τα μονοκύτταρα με το μπλε χρώμα εκφράζουν σε ποσοστό 73,2% τον δείκτη CD209 (γραμμή I). Τα μονοκύτταρα με υψηλό εκθέτη έκφρασης του CD14, που απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, εκφράζουν κατά 100% τον δείκτη CD209 (γραμμή E). Τα λεμφοκύτταρα που απεικονίζονται με το πράσινο χρώμα εκφράζουν σε μικρό ποσοστό 20,6% τον δείκτη CD209 (γραμμή J).



Εικόνα 25. (Α) CD 16. Επίσης τα μονοκύτταρα με κόκκινο χρώμα εκφράζουν κατά 98,9%, τα μονοκύτταρα με μπλε χρώμα κατά 90,6% και τα λεμφοκύτταρα σε ποσοστό 55,5% τον δείκτη CD16.

(Β) CD 33. Παρατηρούμε ότι τα κόκκινα μονοκύτταρα εκφράζουν κατά 95,8%, τα μπλε κατά 62,4% και τα λεμφοκύτταρα κατά 11,6% τον δείκτη CD33.

(Γ) CD 34. Παρατηρούμε ότι τα κόκκινα μονοκύτταρα εκφράζουν κατά 83,1%, τα μπλε κατά 38,8% και τα λεμφοκύτταρα κατά 1,4% τον δείκτη CD34.

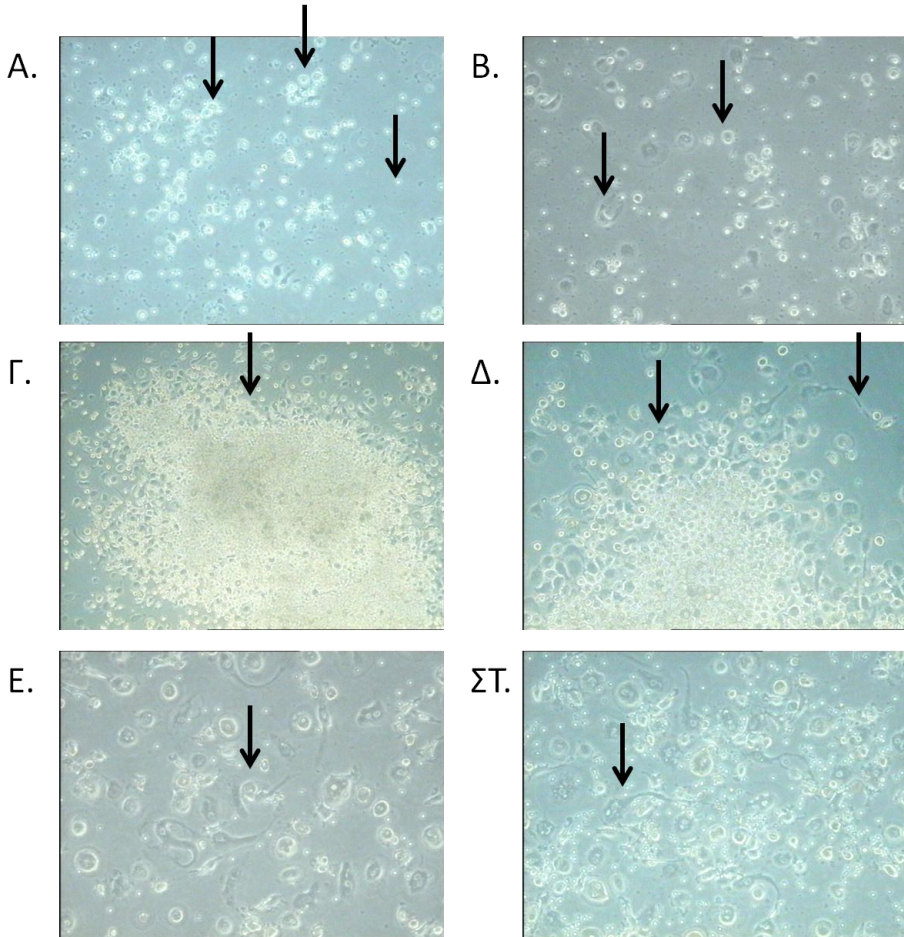
DDD. CD έκφραση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια των καλλιιεργειών

Πίνακας 3. Μέση CD έκφραση των καλλιιεργημένων μονοκυττάρων ± SD (CD45+ και CD14+)					
Διάρκεια κ/ας και παρουσία αυξητικών παραγόντων (GFs)	Ημέρα 1 Απομόνωση (n=3)	Ημέρα 7 GFs παρόντες (n=10)	Ημέρα 14 GFs παρόντες (n=9)	Ημέρα 7 GFs απόντες (n=3)	Ημέρα 14 GFs απόντες (n=3)
Μονοκύτταρα ως % των CD45+ κυττάρων	13.64±4.04	78.69±11.69	66.08±10.74	70.90±7.19	79.63±6.91
CD209	13.95±4.76	88.77±11.5	79.02±11.07	75.87±9.54	95.10±1.41
CD16	48.79±13.46	97.74±2.74	91.18±10.28	85.53±6.49	99.15±0.31
CD33	60.02±2.12	88.16±13.01	76.80±16.36	66.41±2.04	96.46±0.36
CD34	7.27±3.23	68.53±14.34	55.96±18.99	35.3±16.12	76.79±9.05

Πίνακας 4. Μέση CD έκφραση των καλλιιεργημένων λεμφοκυττάρων ± SD (CD45+ και CD14-)					
Διάρκεια κ/ας και παρουσία αυξητικών παραγόντων (GFs)	Ημέρα 1 Απομόνωση (n=3)	Ημέρα 7 GFs παρόντες (n=10)	Ημέρα 14 GFs παρόντες (n=9)	Ημέρα 7 GFs απόντες (n=3)	Ημέρα 14 GFs απόντες (n=3)
Λεμφοκύτταρα ως % των CD45+ κυττάρων	86.36±4.04	21.31±11.69	33.92±10.74	29.1±7.19	20.38±6.91
CD209	0.05±0.04	4.98±6.43	4.32±4.45	0.99±1.72	0.41±0.58
CD16	9.79±3.27	62.33±12.70	33.45±8.79	39.47±16.09	47.85±15.18
CD33	1.07±0.16	10.84±8,75	5.15±8.35	1.47±0.73	1.67±1.15
CD34	0.01±0.01	1.52±2.47	1.05±2.65	0.00±0.0	0.00±0.0

XX. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

ΕΕΕ. Οπτικό μικροσκόπιο



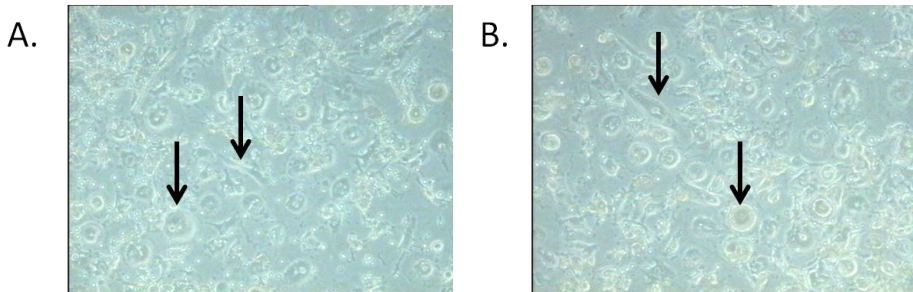
Εικόνα 26. Α. 3η ημέρα καλλιέργειας μόνο με RPMI και ορό. Τα κύτταρα αρχίζουν να μεγαλώνουν σε μέγεθος και να ομαδοποιούνται. Στα μονοκύτταρα που είναι κολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου αρχίζει να διαγράφεται ο πυρήνας τους, ενώ τα λεμφοκύτταρα παραμένουν μικρά και στρογγυλά. Μεγέθυνση 20x.

Β. 7η ημέρα καλλιέργειας μόνο με RPMI και ορό. Τα κύτταρα αυξάνονται ακόμη περισσότερο σε μέγεθος, ενώ η μορφολογία τους αλλάζει. Ο

πυρήνας μεγαλώνει. Ορισμένα προσκολλώνται πολύ στερεά στον πυθμένα και μοιάζουν με μακροφάγα που απλώνουν το κυτταρόπλασμα τους σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια. Μεγέθυνση 20x.

Γ., Δ. 11η ημέρα καλλιέργειας μόνο με RPMI και ορό. Γ μεγέθυνση 10x. Δ μεγέθυνση 20x. Τα κύτταρα συνεχίζουν να αυξάνουν σε μέγεθος, το ίδιο και οι αποφυάδες τους και ο πυρήνας τους. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα σχηματίζουν τη μορφή του πλακόστρωτου σε τμήματα του πυθμένα και τον επενδύουν. Πάνω σε αυτά τα κύτταρα, μία άλλη ομάδα κυττάρων στρογγυλών με μεγάλο πυρήνα, κατάφερε να αναπτύξει μία αποικία. Αυτό, όμως, παρατηρήθηκε σε μία μόνο καλλιέργεια και δεν γενικεύεται.

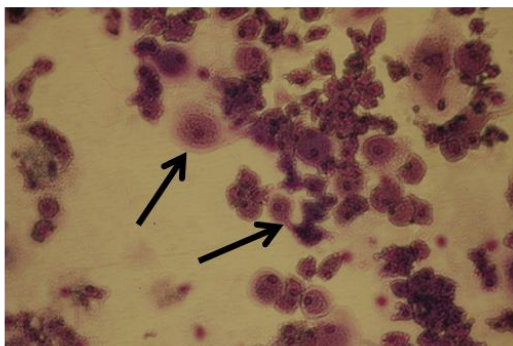
Ε., ΣΤ. 14η ημέρα καλλιέργειας μόνο με RPMI και ορό. Τα κύτταρα σχηματίζουν πλέον εντυπωσιακές δομές, ενώ παράλληλα με τις συνδέσεις τους προσπαθούν να καλύψουν όλη την επιφάνεια του πυθμένα. Τα κύτταρα της αποικίας ελαττώνονται και διασκορπίζονται στην περιφέρεια. Προφανώς, δεν παράγουν πλέον πρωτεΐνες που να τα συνδέουν μεταξύ τους. Επίσης, σταμάτησε το ερέθισμα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, χωρίς όμως να αλλάξει κάτι στις συνθήκες της καλλιέργειας. Αρκετά κύτταρα έχουν αποφυάδες, οι οποίες έχουν μέγεθος πολλαπλάσιο ενός μέσου κυττάρου. Μεγέθυνση 20x.



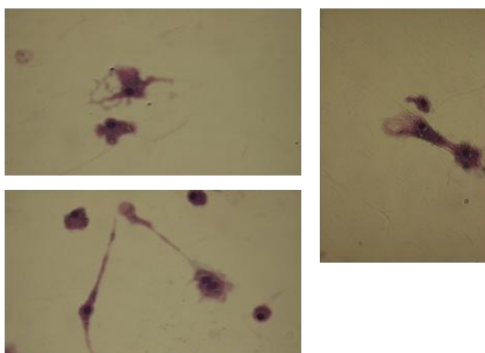
Εικόνα 27 Α., Β. 17η ημέρα καλλιέργειας μόνο με RPMI και ορό. Πλέον υπάρχει μεγάλη ποικιλία στη μορφολογία των κυττάρων. Όλα τα είδη κυττάρων συνδέονται στερεά μεταξύ τους και αρμονικά δημιουργούν υποτυπώδεις δομές. Παρατηρούνται πλέον κύτταρα στρογγυλά που έχουν τεράστιο πυρήνα, βαθυχρωματικό και λίγο κυτταρόπλασμα στην περιφέρειά τους. Είναι τα μεγαλύτερα κύτταρα που έχουν παρατηρηθεί σε όλη τη σειρά των πειραμάτων. Είναι στερεά συνδεδεμένα με τον πυθμένα και μεταξύ τους. Πιθανόν να είναι και τα πιο πολυδύναμα. Μεγέθυνση 20x.

FFF. Ιστολογικές χρώσεις κυττάρων

A.



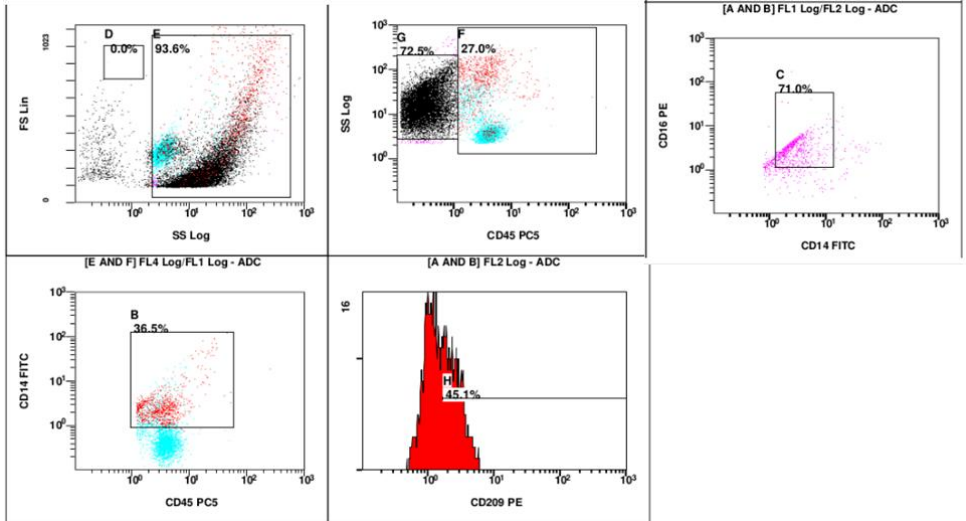
B.



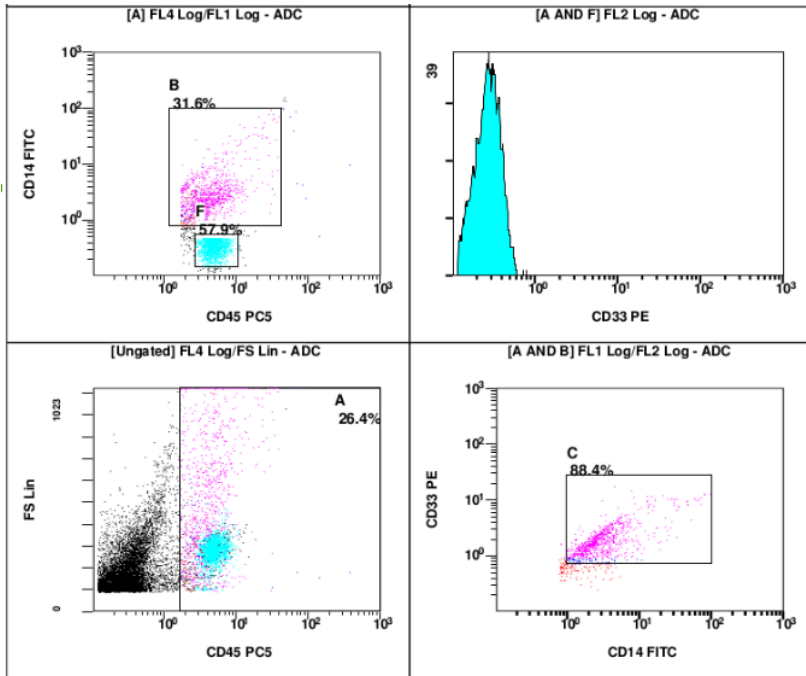
Εικόνα 28. A. Η μεγέθυνση των κυττάρων έγινε σε κλίμακα 40x. Παρατηρούμε μεγάλα στρογγυλά κύτταρα και μικρότερα ελλειπτικά, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν υποτυπώδεις δομές. Τα κύτταρα είναι μεγάλα και λαμβάνουν διάφορα σχήματα. Ο πυρήνας είναι ακόμη μεγαλύτερος και βρίσκεται έκκεντρα. Υπάρχουν ορατές συνδέσεις και επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Τα κύτταρα είναι πολύ καλά προσκολλημένα στην επιφάνεια του τρυβλίου.

B. Επίσης στις καλλιέργειες των κυττάρων παρατηρούμε διάφορα μορφολογικά σχήματα, που αντιστοιχούν σε ξεχωριστούς λειτουργικούς ρόλους. Άρα, τα κύτταρα έχουν ξεκλειδώσει αρκετά γονίδια και έχουν πλέον μορφολογία κυττάρων των ιστών.

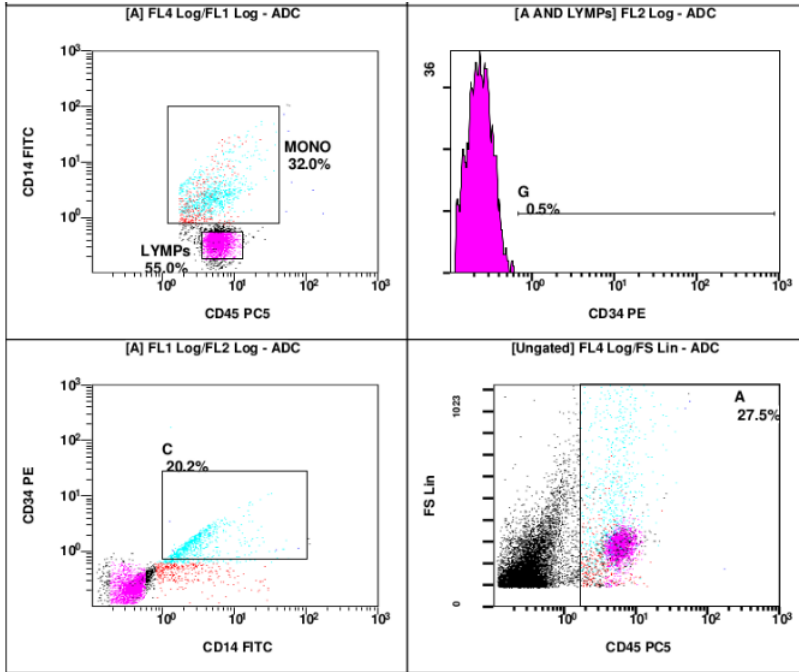
GGG. Κυτταρομετρία κατά την 7η ημέρα καλλιέργειας



Εικόνα 29. Παρατηρούμε ότι τα λευκά αιμοσφαίρια που εκφράζουν τον δείκτη CD45 αποτελούν το πλαίσιο F και αποτελούν το 27% του συνόλου των μετρημένων σωματιδίων. Τα μονοκύτταρα αποτελούν το 36,5% των κυττάρων της καλλιέργειας, όπως φαίνεται από το πλαίσιο B. Εκφράζουν το CD209 σε συχνότητα τουλάχιστον 45,1%. Τα μονοκύτταρα εκφράζουν τον δείκτη CD16 σε ποσοστό τουλάχιστον 71% όπως φαίνεται από το πλαίσιο C στη δεξιά άνω γωνία της εικόνας.

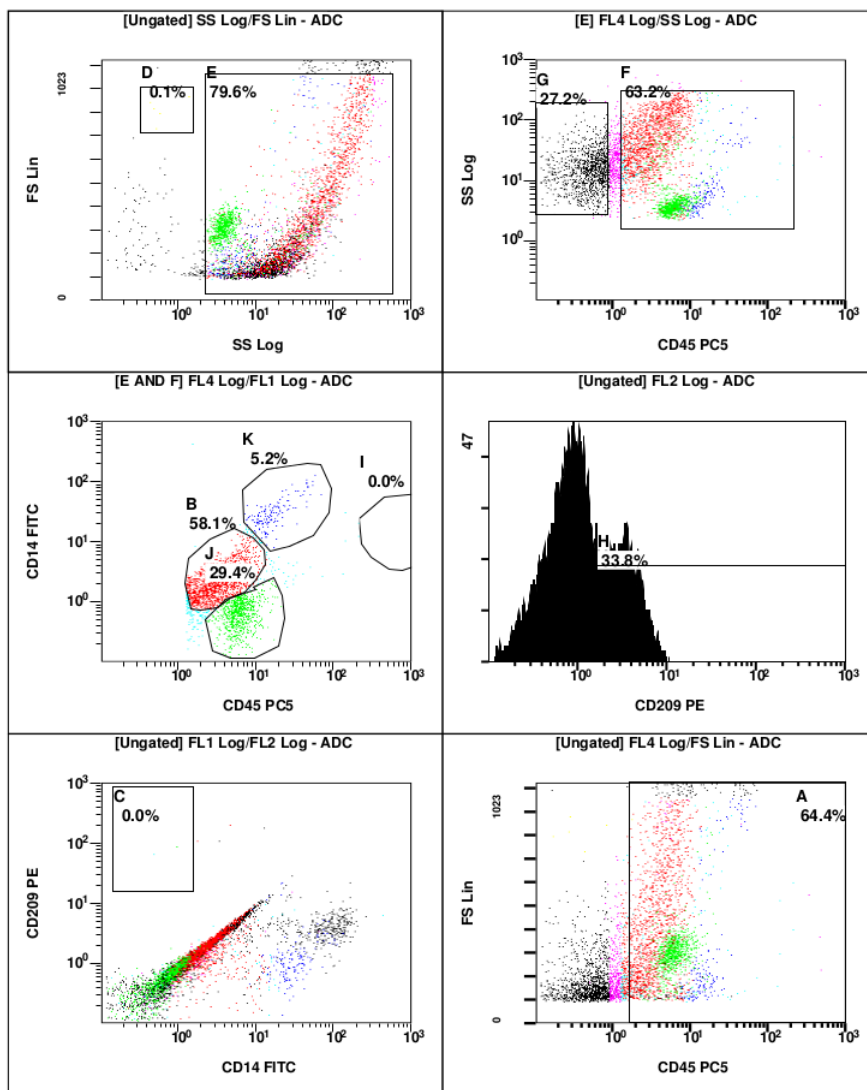


Εικόνα 30. Παρατηρούμε ότι τα λεμφοκύτταρα με το γαλάζιο χρώμα δεν παράγουν καθόλου CD33, ενώ τα μονοκύτταρα με το μωβ και κόκκινο χρώμα παράγουν CD33 σε ποσοστό 88,4%, όπως φαίνεται από το πλαίσιο C.

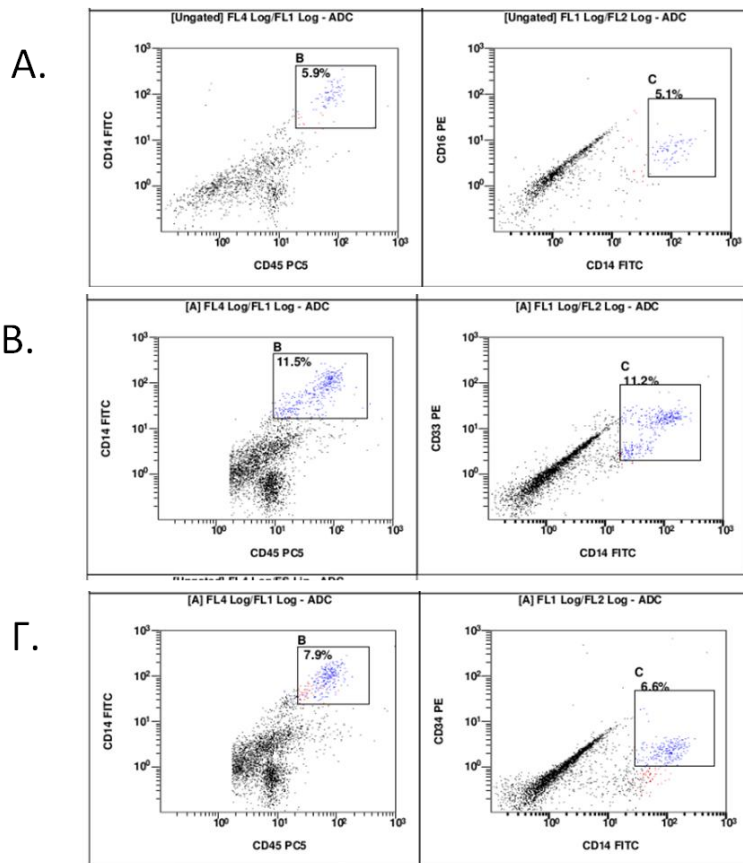


Εικόνα 31. Παρατηρούμε ότι τα μονοκύτταρα παράγουν σε ποσοστό 20,2% τον δείκτη CD34 στην επιφάνειά τους (πλαίσιο C). Είναι αξιοσημείωτο ότι είναι γραμμική η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη CD14 και CD34. Όσο πιο πολύ εκφράζεται ο ένας δείκτης, τόσο πιο πολύ εκφράζεται και ο άλλος. Αυτό φαίνεται από τη γαλάζια ευθεία που σχηματίζεται στο πλαίσιο C.

HHH. Κυτταρομετρία κατά τη 14η ημέρα καλλιέργειας



Εικόνα 32. Παρατηρούμε ότι υπάρχουν τρεις ξεχωριστοί πληθυσμοί κυτάρων. Ο πράσινος πληθυσμός αντιστοιχεί στα λεμφοκύτταρα, ο κόκκινος στα μονοκύτταρα που εκφράζουν ελαφρά τον δείκτη επιφανείας CD14 και ο μπλε στα μονοκύτταρα που εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τον δείκτη επιφανείας CD14. Τα κόκκινα μονοκύτταρα με ποσοστό 29,4% από το πλαίσιο J εκφράζουν κυρίως τον δείκτη CD209. Αυτό φαίνεται στο γράφημα CD14-CD209.



Εικόνα 33. Α. Τα μονοκύτταρα, όσο πιο πολύ εκφράζουν τον δείκτη CD14, τόσο πιο πολύ εκφράζουν και τον δείκτη CD16, όπως φαίνεται από το αντίστοιχο γράφημα.

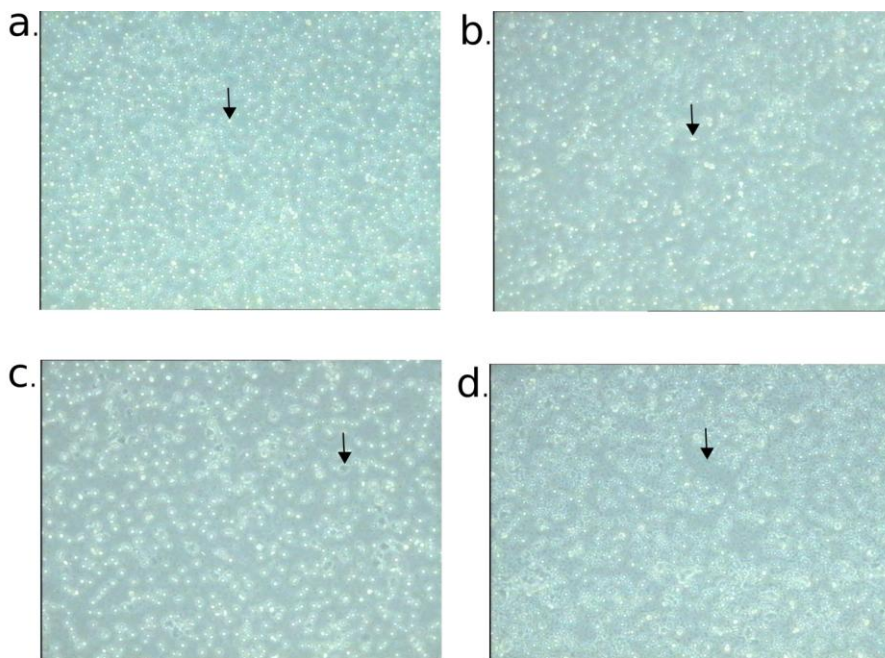
Β. Τα μονοκύτταρα όσο πιο πολύ εκφράζουν τον δείκτη CD14 τόσο πιο πολύ εκφράζουν και τον δείκτη CD33.

Γ. Τα μονοκύτταρα, όσο πιο πολύ εκφράζουν τον δείκτη CD14 τόσο πιο πολύ εκφράζουν και τον δείκτη CD34.

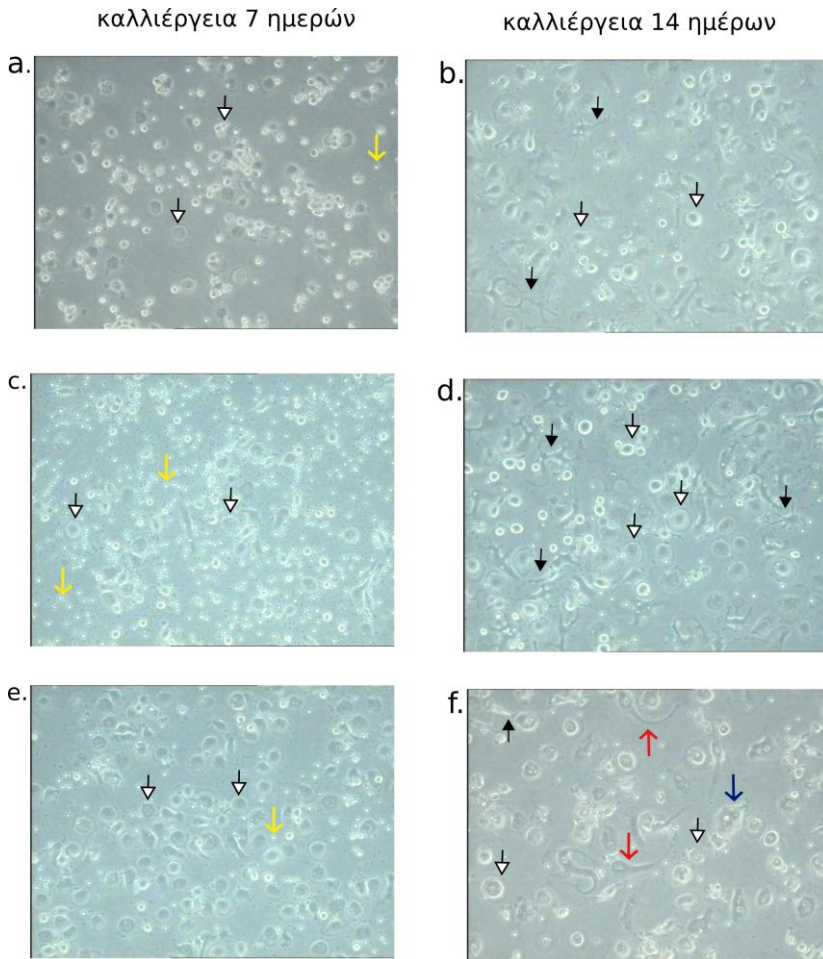
Τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν 2 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα.

XXI. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥΣ

XXII. Οπτικό μικροσκόπιο



Εικόνα 34. Μορφολογία των απομονωμένων μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων την πρώτη ημέρα. Τα μαύρα βέλη δείχνουν ένα κύτταρο σε κάθε οπτικό πεδίο. (α) Μετά την απομόνωση, τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα είναι μικρά και στρογγυλά κύτταρα. (β) Στη συνέχεια τα κύτταρα προοδευτικά παίρνουν ελλειψοειδές σχήμα. Αυτό είναι το πρώτο βήμα για τον σχηματισμό αποφυάδων. Ταυτόχρονα προσκολλώνται στον πυθμένα του πηγαδιού. (γ) Ορισμένα κύτταρα αναπτύσσουν μεγαλύτερο και σκουρότερο κυτταρόπλασμα. (δ) Ορισμένα αιμοπετάλια στην καλλιέργεια παραμένουν παρά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων με τη φικόλη. Παράλληλα ορισμένα κύτταρα καταστρέφονται από τη φυγοκέντρηση και τα κυτταρικά υπολείμματα βρίσκονται στον πυθμένα του πηγαδιού. Κάθε φορά που ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό μειώνονται και τα αιμοπετάλια και τα κυτταρικά υπολείμματα. Τα κύτταρα δεν είναι χρωματισμένα. Μεγέθυνση 20x.



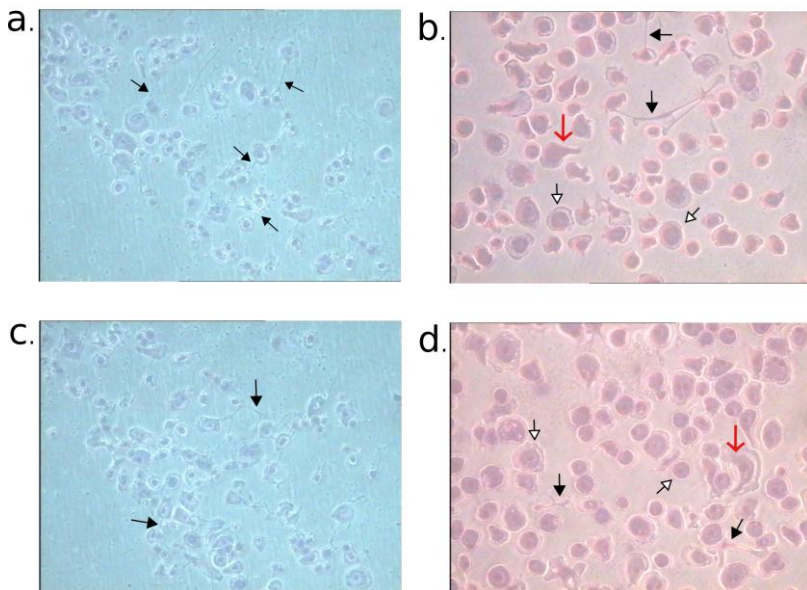
Εικόνα 35. Μορφολογικές αλλαγές στα μονοκύτταρα της καλλιέργειας, όπως παρατηρούνται με το οπτικό μικροσκόπιο. Τα μονοκύτταρα συνεχώς αλλάζουν τη μορφολογία τους και το μέγεθός τους καθόλη τη χρονική περίοδο της καλλιέργειας. Τα λευκοκύτταρα παραμένουν αμετάβλητα. Τα άσπρα βέλη δείχνουν μονοκύτταρα που μεγαλώνουν σε όγκο την έβδομη ημέρα της καλλιέργειας και μεγαλώνουν περαιτέρω τη 14^η ημέρα. Και ο πυρήνας τους και το κυτταρόπλασμα τους είναι μεγαλύτερο σε μέγεθος σε σχέση με την εικόνα από την απομόνωσή τους. Η μορφολογία τους πλέον ομοιάζει με τη μορφολογία των προγονικών κυττάρων της μυελοειδούς σειράς. Τα μαύρα βέλη δείχνουν ορισμένα κύτταρα που απέκτησαν τη μορφολογία των δενδριτικών κυττάρων τη 14η ημέρα. Τα κόκκινα βέλη επισημαίνουν κύτταρα με μορφολογία μεσεγχυματικών κυττάρων. Το μπλε

βέλος δείχνει ένα κύτταρο που ομοιάζει με τη μορφολογία της μυελοβλάστης. Τα κίτρινα βέλη επισημαίνουν τα λεμφοκύτταρα που παραμένουν μορφολογικά αμετάβλητα. Τα κύτταρα στις εικόνες (a), (b), (c), (d) καλλιεργήθηκαν με την παρουσία αυξητικών παραγόντων και τα κύτταρα στις εικόνες (e), (f) καλλιεργήθηκαν χωρίς αυξητικούς παράγοντες. Τα κύτταρα δεν χρωματίστηκαν. Μεγέθυνση 20x.

III. Ιστολογικές χρώσεις

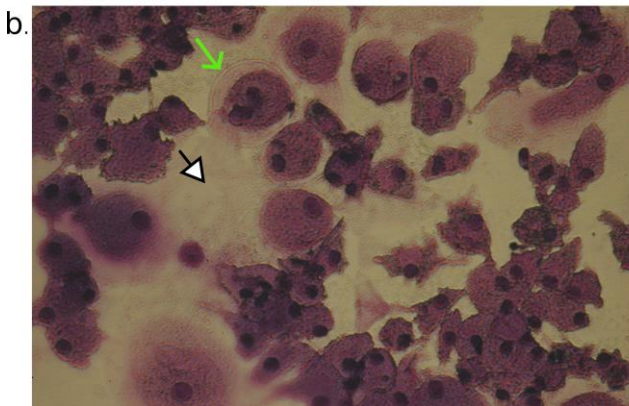
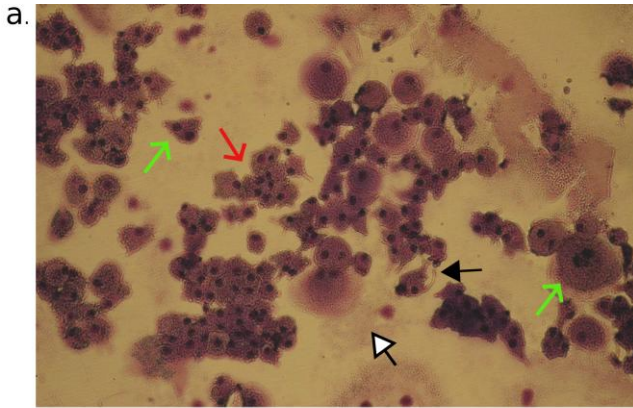
καλλιέργεια 7 ημερών

καλλιέργεια 14 ημερών

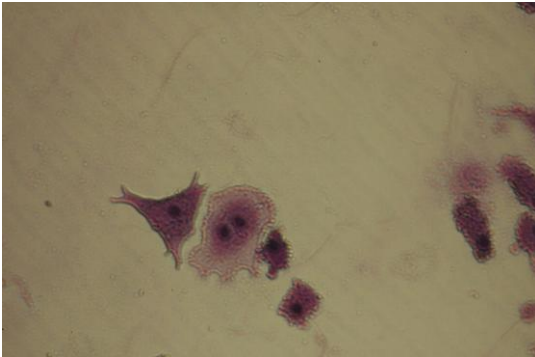
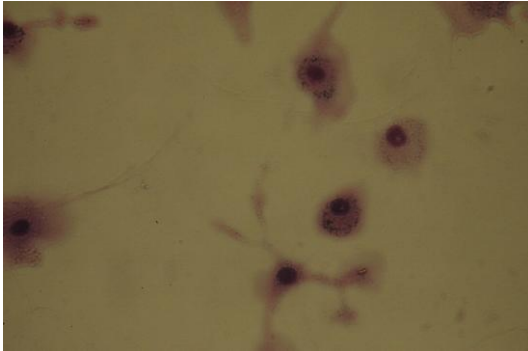


Εικόνα 36. Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από ιστολογική χρώση των κυττάρων με May Grunwald-Giemsa. Η αύξηση του μεγέθους των πυρήνων και η δημιουργία κυτταρικών συνδέσεων απεικονίζονται καθαρά (μαύρα βέλη). Οι κυτταρικές αποφυάδες είναι λεπτότερες την 7η ημέρα σε σύγκριση με τη 14η ημέρα. Τα κύτταρα είναι πολύ καλά προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου. Τα μαύρα βέλη στις καλλιέργειες 14 ημερών επισημαίνουν τους ανεπτυγμένους κυτταρικούς άξονες/αποφυάδες. Η μορφολογία των κυττάρων ομοιάζει με τη μορφολογία των δενδριτικών κυττάρων. Τα άσπρα βέλη δείχνουν τα κύτταρα με μορφολογία προγονικών κυττάρων. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τα κύτταρα με μορφολογία μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα κύτταρα στις εικόνες (a) και (b) αναπτύχθηκαν με την παρουσία αυξητικών παραγόντων,

ενώ τα κύτταρα στις εικόνες (c) και (d) χωρίς αυξητικούς παράγοντες. Μεγέθυνση 20x.

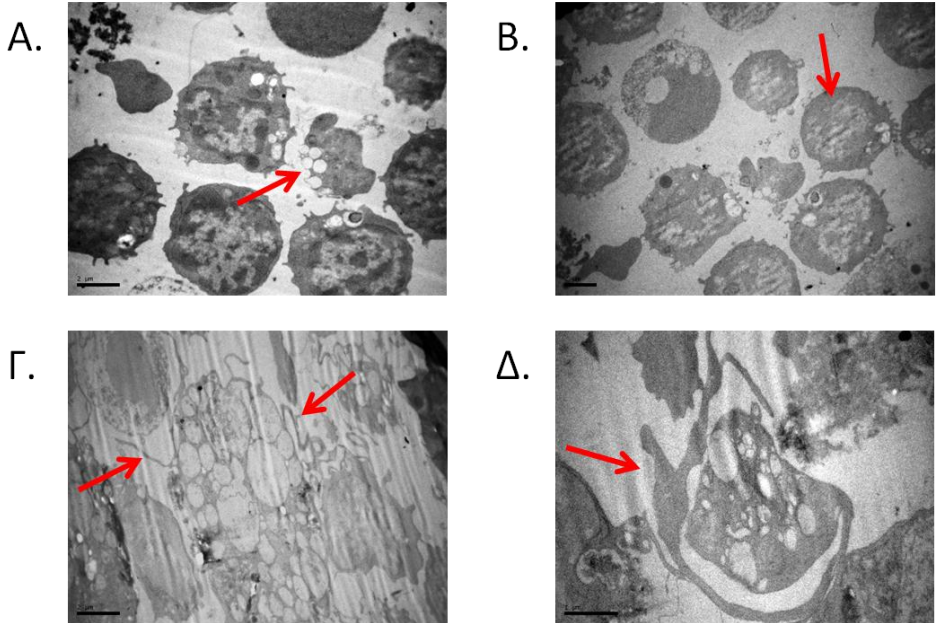


Εικόνα 37. Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο των κυτταροκαλλιεργειών τη 14η ημέρα ύστερα από ιστολογική χρώση με May Grunwald-Giemsa. Τα κύτταρα ενώνονται μεταξύ τους με συνδέσεις διαμεμβρανικές (κόκκινο βέλος). Ορισμένα αναπτύσσουν αποφυάδες (μαύρο βέλος). Ένα νέο είδος σύνδεσης αποκαλύπτεται σε αυτή τη μεγέθυνση. Τα κύτταρα προσκολλώνται σταθερά στον πυθμένα του πηγαδιού, επεκτείνουν το κυτταρόπλασμά τους και το ενώνουν με τα γειτονικά κύτταρα (άσπρα βέλη). Επίσης, διακρίνονται κύτταρα με δύο πυρήνες (πράσινα βέλη). Μεγέθυνση 40x.



Εικόνα 38. Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο των κυτταροκαλλιεργειών τη 14η ημέρα ύστερα από ιστολογική χρώση με May Grunwald-Giemsa. Παρατηρούμε πληθώρα σχημάτων που αντιστοιχεί σε πληθώρα λειτουργιών. Όπως φαίνεται τα μονοπύρρηνα έχουν ξεκλειδώσει αρκετά γονίδια που συναντώνται στους ιστούς και όχι στο αίμα. Τα κύτταρα πλέον δεν λειτουργούν ως μονάδες αλλά ως ομάδα. Μεγέθυνση 40x.

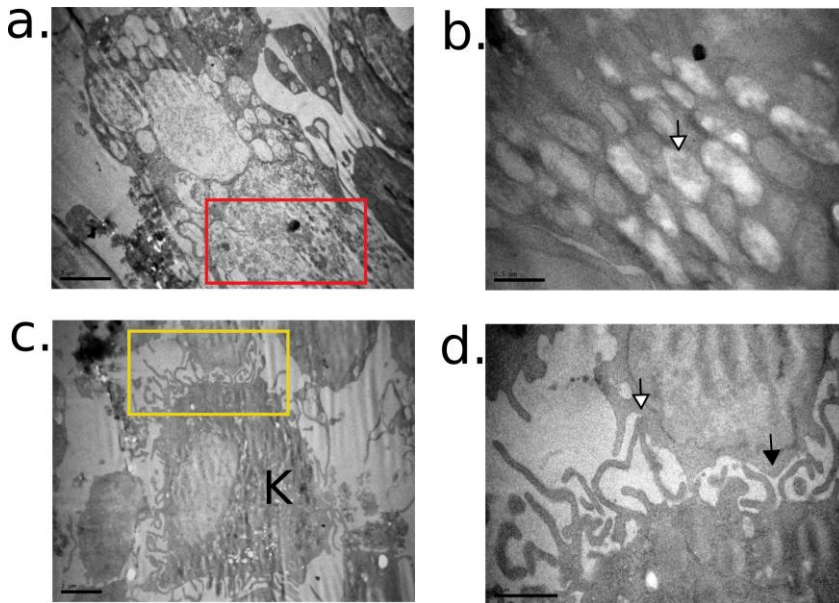
JJJ. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Εικόνα 39. Α., Β. Την 7η ημέρα καλλιέργειας παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν κοκκία

αποθηκευτικά στο κυτταρόπλασμα τους. Ταυτόχρονα, το κύτταρο και ο πυρήνας μεγαλώνουν. Τα ψευδοπόδια διατηρούνται και αυξάνονται σε αριθμό, στοχεύοντας τα γειτονικά κύτταρα.

Γ., Δ. Όλα τα κύτταρα αναπτύσσουν μακριές αποφυάδες και συνδέονται μεταξύ τους. Τα κύτταρα έχουν διάφορα σχήματα και συνδέονται μεταξύ τους με διαφόρων τύπων αποφυάδες.



Εικόνα 40. Εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των διαφοροποιημένων μονοκυττάρων ύστερα από 14 ημέρες καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες. (a) Τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα περιέχουν πολλά αποθηκευτικά κοκκία (κόκκινο παραλληλόγραμμο). (b) Τα κοκκία είναι γεμάτα με πρωτεΐνες (άσπρο βέλος). (c) Το κύτταρο μονοκυτταρικής προέλευσης K προβάλλει μεγάλες αποφυάδες. (d) Το κίτρινο παραλληλόγραμμο μεγεθύνεται. Το κεντρικό κύτταρο C συνδέεται με τα γειτονικά κύτταρα με στερεές διαμεμβρανικές συνδέσεις (άσπρο βέλος) και με σύνδεση που ομοιάζει με σύναψη (μαύρο βέλος). Μεγέθυνση a) 10.000x, b) 40.000x, c) 8.000x, d) 25.000x.

ΚΚΚ. Ανάλυση της μορφολογίας των κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο καλλιέργειας

Στο ξεκίνημα των καλλιεργειών τα κύτταρα έχουν μικρό και στρογγυλό σχήμα. Τα μονοκύτταρα δεν μπορούν να διακριθούν οπτικά από τα λεμφοκύτταρα.

1. Μονοκύτταρα

Καθώς περνάνε οι ημέρες της καλλιέργειας ορισμένα κύτταρα αναπτύσσουν αποφυάδες. Ύστερα από 14 ημέρες, το σχήμα των κυττάρων γίνεται ακανόνιστο και μορφολογικά μοιάζουν πλέον με μεσεγχυματικά, δενδριτικά και προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς.

Σταδιακά, ενώνονται με τα γειτονικά κύτταρα με διάφορες συνδέσεις. Αναπτύσσουν διαμεμβρανικές συνδέσεις, αποφυάδες ή ενώνουν τα κυτταροπλάσματά τους. Ορισμένα κύτταρα δημιουργούν διπλό πυρήνα. Παρατηρήθηκαν τα ίδια κύτταρα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ύστερα από 14 ημέρες καλλιέργειας με την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα συνδέονται με τα γειτονικά τους με διαμεμβρανικές συνδέσεις στερεές και χαλαρές. Οι χαλαρές συνδέσεις είναι μία μορφή σύναψης. Τα κύτταρα έχουν ποικίλη μορφολογία που ανταποκρίνεται προφανώς στον διαφορετικό ρόλο που έχει το καθένα μέσα στην καλλιέργεια.

2. Λεμφοκύτταρα

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα λεμφοκύτταρα διατηρούν το μικρό τους μέγεθος και το στρογγυλό τους σχήμα σε όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών. Δεν αλλάζουν μορφολογία. Είτε πλέον ελεύθερα μέσα στο υπερκείμενο είτε βρίσκονται πάνω στη μεμβράνη των μονοκυττάρων. Δεν σχηματίζουν αποφυάδες. Δεν δημιουργούν κυτταρικές συνδέσεις. Η επαφή της μεμβράνης τους με τη μεμβράνη του γειτονικού κυττάρου είναι η μόνη σύνδεση που απεικονίζεται.

XXIII. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ELISA

LLL. Κυτταρομετρία ροής

Ο δείκτης επιφανείας (cluster of differentiation – CD) που είναι χαρακτηριστικός για κάθε κύτταρο αναγράφεται στον πίνακα 2. Τα CD33 και CD34 αντιστοιχούν σε προγονικές μορφές των μονοκυττάρων, ενώ τα CD16 και CD209 αντιστοιχούν σε μεταγενέστερες μορφές. Η έκφραση του δείκτη επιφανείας των μονοκυττάρων CD14 κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας φαίνεται στον Πίνακα 3. Ο μέσος όρος των μονοκυττάρων (CD14 και CD45 θετικά) στην αρχή των καλλιεργειών ήταν $13.64 \pm 4.04\%$ (μέσος \pm SD). Τα υπόλοιπα κύτταρα ήταν λεμφοκύτταρα. Την έβδομη ημέρα τα CD14 θετικά κύτταρα αυξήθηκαν ποσοστιαία στο $78.69 \pm 11.69\%$, επειδή τα λεμφοκύτταρα αιωρούνται στο υπερκείμενο και απορρίπτονται μαζί με αυτό. Τα λεμφοκύτταρα δεν προσκολλώνται στα πλαστικά του τρυβλίου. Αιωρούνται ελεύθερα στο υπερκείμενο. Τα λεμφοκύτταρα μειώνονται κάθε φορά που αντικαθίσταται το υπερκείμενο. Τη 14η ημέρα το ποσοστό των CD14 θετικών κυττάρων ήταν $66.08 \pm 10.74\%$.

Η αλλαγή στους δείκτες επιφανείας των μονοκυττάρων (CD markers) σύμφωνα με τη διάρκεια των καλλιεργειών αποτυπώνεται στον Πίνακα 3. Τα μονοκύτταρα την πρώτη ημέρα των καλλιεργειών ήδη εξέφρασαν ταυτόχρονα δείκτες ωριμότητας CD16 $48.79 \pm 13.46\%$ και αωρότητας CD34 $7.27 \pm 3.23\%$ (μέσος \pm SD). Όταν ήταν παρόντες οι αυξητικοί παράγοντες, την

έβδομη ημέρα τα μονοκύτταρα εξέφρασαν σε μεγάλο ποσοστό CD209 $88.77 \pm 11.5\%$, που αντιστοιχεί στα δενδριτικά κύτταρα, και CD16 $97.74 \pm 2.74\%$, που αντιστοιχεί στα μακροφάγα. Παράλληλα εκφράζουν CD33 $88.16 \pm 13.01\%$ και CD34 $68.53 \pm 14.34\%$, που είναι άωροι δείκτες. Άρα, τα μονοκύτταρα εξελίσσονται σε κύτταρα που εκφράζουν ταυτόχρονα ώριμους και άωρους δείκτες επιφανείας. Τη 14η ημέρα τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα διατηρούν τους δείκτες ωριμότητάς τους CD209 $79.02 \pm 11.07\%$ και CD16 $91.18 \pm 10.28\%$. Επίσης, μειώνουν τους δείκτες αωρότητάς τους CD33 $76.80 \pm 16.36\%$ και CD34 $55.96 \pm 18.99\%$. Επομένως, τα κύτταρα σταδιακά χάνουν την πολυδυναμία τους. Τα μονοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων εξελίσσονται με πιο αργά βήματα στα ίδια ποσοστά CD δεικτών. Τη 14η ημέρα σχεδόν όλα τα μονοκύτταρα (CD14 θετικά) εκφράζουν CD209 $95.1 \pm 1.41\%$, CD33 $96.46 \pm 0.36\%$ και CD16 $99.15 \pm 0.31\%$. Επίσης εκφράζουν το υψηλότερο ποσοστό του CD34 $76.79 \pm 9.05\%$.

Τα λεμφοκύτταρα εξελίσσονται σε πολύ διαφορετική CD έκφραση (Πίνακας 4). Ύστερα από την απομόνωση, τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό $9.79 \pm 3.27\%$ τον δείκτη CD16, που αντιστοιχεί στον δείκτη των Natural Killer κυττάρων. Καλλιεργημένα με την παρουσία των αυξητικών παραγόντων, τα λεμφοκύτταρα αυξάνουν την έκφραση του CD16 την έβδομη ημέρα στο ποσοστό $62.33 \pm 12.70\%$ και την ξαναμειώνουν τη 14η ημέρα στο ποσοστό $33.45 \pm 8.79\%$. Καλλιεργημένα χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων, τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν τον δείκτη επιφανείας CD16 την έβδομη ημέρα $39.47 \pm 16.09\%$ και τη 14η ημέρα $47.85 \pm 15.18\%$.

MMM. Αποτελέσματα μετρήσεων ινσουλίνης με μέθοδο ELISA

Η ινσουλίνη μετρήθηκε στο υπερκείμενο των καλλιέργειών στις παρακάτω ομάδες: 1) Κύτταρα κατά τη στιγμή της απομόνωσης, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν έχουμε προσμίξεις ινσουλίνης στο αρχικό δείγμα και φυσικά ότι τα κύτταρα δεν παράγουν σε τόσο πρώιμο στάδιο ινσουλίνη. 2) Κύτταρα κατά την 7η ημέρα καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες, ώστε να διαπιστωθεί αν παράγουν ινσουλίνη και σε τι ποσότητα. 3) Κύτταρα κατά τη 14η ημέρα της καλλιέργειας με παρουσία αυξητικών παραγόντων 4) Κύτταρα κατά τη 14η μέρα καλλιέργειας χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων.

Έγιναν δύο μετρήσεις για κάθε ομάδα. Μία με ποσότητα γλυκόζης 100 mg/dl στο υπερκείμενο και μία μετά την προσθήκη γλυκόζης και αύξηση της συγκέντρωσης στα 250 mg/dl. Τα κύτταρα παρέμειναν σε συνθήκες αυξημένης γλυκόζης για μία ώρα. Με αυτό τον τρόπο φαίνεται η αντίδραση των κυττάρων στην αύξηση των επιπέδων γλυκόζης. Ο όγκος της καλλιέργειας (υπερκείμενο) ήταν σταθερά 2 ml.

Η μονάδα μέτρησης της ινσουλίνης είναι $\mu\text{U/ml}$. Η αντιστοιχία είναι περίπου

100 μU = 4 ng. Άρα το 1 μU = 0,04 ng ινσουλίνης. Το όριο ανίχνευσης ινσουλίνης σε ένα δείγμα είναι τα 0,17 $\mu\text{U}/\text{ml}$, σύμφωνα με τον κατασκευαστή του kit μέτρησης ινσουλίνης ELISA (KAQ 1251 Invitrogen). Τα κύτταρα μετρήθηκαν στην αρχή των καλλιέργειών σε πλάκα Neubauer. Αρχικά τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι 2×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας ήταν περίπου 100.000, μετρημένα ξανά σε πλάκα Neubauer. Η μείωση του αριθμού των κυττάρων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην απόρριψη των λεμφοκυττάρων κατά την αντικατάσταση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού. Επίσης ορισμένα μονοκύτταρα αποπύπτουν ιδίως τις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας, ώστε να δημιουργηθεί χώρος για ανάπτυξη των υπολοίπων κυττάρων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ινσουλίνης με τη μέθοδο ELISA παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Την πρώτη ημέρα δεν ανιχνεύθηκε ινσουλίνη στο υπερκείμενο. Προστέθηκε γλυκόζη στο υπερκείμενο και αυξήθηκε η συγκέντρωση γλυκόζης στα 250 mg/dl. Τα κύτταρα παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες επί μία ώρα. Ξανά δεν ανιχνεύθηκε ινσουλίνη στο υπερκείμενο.

Τα μονοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν με την παρουσία αυξητικών παραγόντων για επτά ημέρες έκκριναν 10.32 ± 6.78 μU (μέσος \pm SD) ινσουλίνη στο υπερκείμενο. Όταν η διάρκεια της καλλιέργειας επεκτάθηκε στις 14 ημέρες, έκκριναν κατά μέσο όρο 17.03 ± 12.76 μU . Δηλαδή η μέση έκκριση ινσουλίνης αυξήθηκε κατά 70% με τον διπλασιασμό του χρόνου της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, προστέθηκε γλυκόζη εξωγενώς στο υπερκείμενο. Τότε ορισμένες καλλιέργειες αύξησαν την έκκριση ινσουλίνης, ενώ άλλες δέσμευσαν την ινσουλίνη στους υποδοχείς της μεμβράνης τους και σταμάτησαν την έκκρισή της. Αυτές οι μεταβολές έχουν μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στις καλλιέργειες (Πίνακας 5).

Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν χωρίς αυξητικούς παράγοντες για 14 ημέρες, παράγαγαν κατά μέσο όρο 15.05 ± 6.2 μU (μέσος \pm SD) ινσουλίνη. Αυτή η τιμή είναι κατά 22% μικρότερη σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που έγιναν με την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Ύστερα από την προσθήκη επιπλέον γλυκόζης στο υπερκείμενο, όλες οι καλλιέργειες αύξησαν την έκκριση ινσουλίνης. Η μέση έκκριση ινσουλίνης ήταν 22.81 ± 6.02 μU ανά πηγαδάκι. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ένα καθαρά βιολογικό φαινόμενο, το οποίο επαναλήφθηκε σταθερά σε όλα τα πειράματα. Η έκκριση της ινσουλίνης ρυθμίστηκε σύμφωνα με τα επίπεδα γλυκόζης. Η μέση αύξηση της ινσουλίνης στο υπερκείμενο μέσα σε μία ώρα ήταν 7.76 μU ή 0.28 ng ανά 10^5 κύτταρα (Πίνακας 5).

Οι τύποι μετατροπής των μονάδων της ινσουλίνης είναι 1 $\mu\text{U}/\text{ml}$ = 0.04 ng/ml και 1 $\mu\text{U}/\text{ml}$ = 7,175 pmol/lit.

Συνοπτικός πίνακας της έκκρισης ινσουλίνης από τα κύτταρα

Πίνακας 5. Ποσότητα ινσουλίνης στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών (όγκος 2 ml – αριθμός κυττάρων 10 ⁵ /πηγάδι)								
Διάρκεια καλλιέργειας και Ομάδα	Ημέρα 1 - Ομάδα 1 Ημέρα απομόνωσης		Ημέρα 7 - Ομάδα 2 Παρουσία αυξητικών παραγόντων		Ημέρα 14 - Ομάδα 3 Παρουσία αυξητικών παραγόντων		Ημέρα 14 - Ομάδα 4 Απουσία αυξητικών παραγόντων	
	100 mg/dl	250 mg/dl	100 mg/dl	250 mg/dl	100 mg/dl	250 mg/dl	100 mg/dl	250 mg/dl
Συγκέντρωση γλυκόζης								
Δείγμα 1	nd	nd	20.32	11.68	27.54	14.87	24.74	30.86
Δείγμα 2	nd	nd	8.50	4.78	53.81	37.54	10.88	24.74
Δείγμα 3	nd	nd	5.48	2.27	31.51	29.56	18.79	28.90
Δείγμα 4	nd	nd	6.96	10.08	4.78	21.08	16.46	21.08
Δείγμα 5	nd	nd	8.50	9.29	8.50	32.14	14.08	23.30
Δείγμα 6	nd	nd	0.89	6.21	7.73	7.73	25.46	27.54
Δείγμα 7	nd	nd	4.09	6.21	30.21	13.28	10.08	23.30
Δείγμα 8	nd	nd	10.88	26.16	23.30	24.02	9.28	18.02
Δείγμα 9	nd	nd	19.56	10.88	12.48	6.21	8.48	9.91
Δείγμα 10	nd	nd	18.02	13.28	15.25	27.39	12.25	20.44
Δείγμα 11					16.6	20.50		
Δείγμα 12					7.97	14.92		
Δείγμα 13					3.16	12.58		
Δείγμα 14					10.93	17.60		
Δείγμα 15					15.91	11.59		
Δείγμα 16					22.88	10.58		
Δείγμα 17					7.61	18.27		
Δείγμα 18					6.41	30.16		
Μέσος όρος ± SD	Δεν ανιχνεύθη κε	Δεν ανιχνεύθη κε	10.32±6.78	10.08±6.60	17.03±12.76	19.45±9.00	15.05±6.20	22.81±6.02
	Ομάδα 1A	Ομάδα 1B	Ομάδα 2A	Ομάδα 2B	Ομάδα 3A	Ομάδα 3B	Ομάδα 4A	Ομάδα 4B

Πίνακας 6. Καλλιέργειες παρουσία αυξητικών παραγόντων – 14η ημέρα				
Παραγόμενη ποσότητα ινσουλίνης από τα κύτταρα της καλλιέργειας				
	Γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό 100 mg/dl	Γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό 250 mg/dl	Διαφορά ινσουλίνης στο υπερκείμενο	ποσοστό μεταβολής % επί της αρχικής τιμής τιμής %
Δείγμα				
1	27,54	14,87	-12,67	-45,99
2	53,81	37,54	-16,27	-30,24
3	31,51	29,56	-1,95	-6,19
4	4,78	21,08	16,3	341,33
5	8,5	32,14	23,64	277,94
6	7,73	7,73	0	0
7	30,21	13,28	-16,94	-56,06
8	23,3	24,02	0,73	3,11
9	12,48	6,21	-6,26	-50,19
10	15,25	27,39	12,14	79,57
11	16,6	20,5	3,89	23,44
12	7,97	14,92	6,95	87,25
13	3,16	12,58	9,42	297,87
14	10,93	17,6	6,67	61,07
15	15,91	11,59	-4,32	-27,16
16	22,88	10,58	-12,29	-53,74
17	7,61	18,27	10,66	139,99
18	6,41	30,16	23,75	370,74
Μέσος όρος	17,03	19,45	2,41	14,17

Πίνακας 7. Καλλιέργειες κυττάρων απουσία αυξητικών παραγόντων – 14η ημέρα				
Παραγόμενη ποσότητα ινσουλίνης από τα κύτταρα της καλλιέργειας μετρημένη σε μU				
	Γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό 100 mg/dl	Γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό 250 mg/dl	Διαφορά ινσουλίνης στο υπερκείμενο	ποσοστό μεταβολής % επί της αρχικής τιμής τιμής %
Δείγμα				
1	24,74	30,86	6,12	24,73
2	10,88	24,74	13,86	127,45
3	18,79	28,9	10,11	53,78
4	16,46	21,08	4,62	28,11
5	14,08	23,3	9,22	65,53
6	25,46	27,54	2,08	8,17
7	10,08	23,3	13,22	131,15
8	9,28	18,02	8,74	94,18
9	8,48	9,91	1,43	16,9
10	12,25	20,44	8,2	66,91
Μέσος όρος	15,05	22,81	7,76	51,57

XXIV. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

Για να γίνει η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS, έκδοση 21.

NNN. Έλεγχος κανονικής κατανομής

Γίνεται έλεγχος αν οι τιμές των ομάδων ακολουθούν την κανονική κατανομή. Αυτό γίνεται για να αποφασισθεί αν θα γίνει χρήση παραμετρικών ή μη παραμετρικών στατιστικών τεστ. Επειδή τα δείγματα σε κάθε ομάδα είναι < 50, θα γίνει χρήση του τεστ Shapiro-Wilk (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Τεστ κανονικότητας Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.
Ομάδα 2A	0,909	10	0,277
Ομάδα 3A	0,86	18	0,012
Ομάδα 4A	0,881	10	0,136
Ομάδα 2B	0,853	10	0,063
Ομάδα 3B	0,958	18	0,567
Ομάδα 4B	0,946	10	0,618

Παρατηρούμε ότι η ομάδα 3A δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή, ενώ οι υπόλοιπες ομάδες την ακολουθούν. Επίσης, οι ομάδες 1A και 1B δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, επειδή όλες οι τιμές τους είναι μηδενικές.

OOO. Ερευνητικό ερώτημα 1. Μπορούν τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα όταν συγκαλλιεργηθούν να παράγουν ινσουλίνη;

Ναι, αυτό είναι εφικτό. Όλες οι ομάδες που καλλιεργήθηκαν παράγαν ινσουλίνη. Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν προς πληθυσμό κυττάρων που είναι ικανός να παράγει ινσουλίνη.

PPP. Ερευνητικό ερώτημα 2. Επηρεάζει ο χρόνος καλλιέργειας την παραγόμενη ποσότητα ινσουλίνης;

Για να απαντηθεί το ερώτημα γίνεται σύγκριση της ποσότητας ινσουλίνης των δειγμάτων μεταξύ της 7ης και της 14ης ημέρας. Επειδή η ομάδα 3A δεν έχει κανονική κατανομή θα τη συγκρίνουμε με μη παραμετρική δοκιμασία με την ομάδα 2A. Το ενδεδειγμένο τεστ είναι το Mann-Whitney για τη σύγκριση δύο ανεξάρτητων δειγμάτων. Παρατηρούμε ότι η τιμή του $P=0,191$ δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Άρα με την πάροδο του χρόνου η διαφορά στην παραγωγή ινσουλίνης από τις καλλιέργειες δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

Mann Whitney test					
Groups	N	Sum of Z	Asymp. Sig.	Exact Sig.	
2A	10	117	-1,343	0,179	0,191
3A	18	289			

QQQ. Ερευνητικό ερώτημα 3. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης αυξηθεί στα 250 mg/dl, εκκρίνουν την ίδια ποσότητα ινσουλίνης η καλλιέργεια των 7 και των 14 ημερών;

Για να το διαπιστώσουμε αυτό θα συγκρίνουμε τις ομάδες 2B και 3B. Οι δύο ομάδες ακολουθούν την κανονική κατανομή και θα τις συγκρίνουμε με παραμετρική δοκιμασία. Η ενδεδειγμένη δοκιμασία για σύγκριση δύο ανεξάρτητων δειγμάτων που έχουν κανονική κατανομή και ίση διακύμανση είναι η δοκιμασία Independent Samples t-test. Παρατηρούμε σύμφωνα με το τεστ του Levene ότι οι δύο ομάδες έχουν ίση διακύμανση με $P=0,112$. Επομένως, ισχύουν τα αποτελέσματα της πρώτης γραμμής. Οι δύο ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά με $p=0,008$. Αυτό σημαίνει ότι σε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης η ομάδα 3B περιέχει στατιστικώς σημαντικά περισσότερη ποσότητα ινσουλίνης από την ομάδα 2B.

Independent samples t-test						
Levene test Sig.	0,112					
Groups	N	Std deviation	Std Error Mean	t	df	Sig. (2-tailed)
2B	10	6,59	2,08	-2,877	26	0,008
3B	18	9	2,12			

RRR. Ερευνητικό ερώτημα 4. Η αύξηση του επιπέδου γλυκόζης επηρεάζει την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης στα ίδια κύτταρα;

Θα γίνει σύγκριση της ίδιας ομάδας πριν και μετά τη χορήγηση γλυκόζης. Θα συγκριθούν οι ομάδες 2A-2B, 3A- 3B και 4A-4B. Η ομάδα 2A θα συγκριθεί με την ομάδα 2B με παραμετρική δοκιμασία, διότι ακολουθούν την κανονική κατανομή. Η ενδεδειγμένη παραμετρική δοκιμασία για σύγκριση του ίδιου δείγματος σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές είναι το paired samples t-test και η αντίστοιχη μη παραμετρική δοκιμασία Wilcoxon Signed Ranks test. Η σύγκριση των ομάδων 2A-2B έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Το ίδιο συνέβη και στις ομάδες 3A-3B, οι οποίες συγκρίνονται με μη παραμετρική δοκιμασία. Αντίθετα, οι ομάδες 4A-4B διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι με την προσθήκη γλυκόζης η ομάδα 4B εκκρίνει στατιστικώς σημαντικά περισσότερη ινσουλίνη από την ομάδα 4A.

Paired samples t-test							
Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	df	Sig. (2-tailed)
2A	10	0,236	7,247	2,291	0,103	9	0,92
2B	10						
4A	10	-7,759	4,225	1,336	-5,807	9	0,000
4B	10						
Wilcoxon Signed Ranks test							
	N						
3A	18						
3B	18						
		Mean Rank	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)			
Negative Ranks	7	8,86	-0,686	0,492			
Positive Ranks	10	9,10					
Ties	1						

SSS. Ερευνητικό ερώτημα 5. Οι αυξητικοί παράγοντες συνετέλεσαν στην αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης ή όχι;

Οι ομάδες 3A και 4A θα συγκριθούν με μη παραμετρική δοκιμασία λόγω της μη κανονικής κατανομής της 3A. Η ενδεδειγμένη δοκιμασία για σύγκριση δύο ανεξάρτητων δειγμάτων είναι η Mann-Whitney test. Οι ομάδες 3B και 4B θα συγκριθούν με παραμετρική δοκιμασία. Η ενδεδειγμένη δοκιμασία είναι το Independent Samples t-test. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ομάδες 3A και 4A δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους με $P=0,811$. Παρομοίως, οι ομάδες 3B και 4B δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους με $p=0,302$. Άρα οι αυξητικοί παράγοντες δεν συνετέλεσαν στατιστικώς σημαντικά στην αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης.

Mann Whitney test					
Groups	N	Sum of Ranks	Z	Asymp. Sig.	Exact Sig.
3A	18	256	-0,240	0,811	0,832
4A	10	150			

ΤΤΤ. Στατιστική σύγκριση της έκκρισης ινσουλίνης μεταξύ των ομάδων

Η έκκριση ινσουλίνης έχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ομάδων. Επιπρόσθετα, η απάντηση των κυττάρων στην άνοδο του επιπέδου γλυκόζης από τα 100 mg/dl στα 250 mg/dl είναι διαφορετική ανάμεσα στις ομάδες (Πίνακας 5). Η στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για να αποκαλύψει αν οι διαφορές που εντοπίζονται είναι στατιστικώς σημαντικές. Οι ομάδες με το γράμμα Α περιείχαν 100 mg/dl γλυκόζη στο υπερκείμενο των καλλιέργειών, ενώ οι ομάδες με το γράμμα Β περιείχαν 250 mg/dl. Τα αποτελέσματα της στατιστικής παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 7.

1. (i) Η ομάδα 2 καλλιεργήθηκε για επτά ημέρες με την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η ομάδα 2B δεν μετέβαλλε την έκκριση ινσουλίνης σε σχέση με την ομάδα 2A ($p=0.920$). Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα δεν μπορούν να μεταβάλλουν την έκκριση ινσουλίνης σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης.

(ii) Η ομάδα 3 καλλιεργήθηκε για 14 ημέρες με την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η ομάδα 3B έκρινε περισσότερη ινσουλίνη (19.45 ± 9.00 μ U) από την ομάδα 3A (17.03 ± 12.76 μ U) (μέσος \pm SD), αλλά το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ($p=0.492$). Άρα τα κύτταρα δεν εκκρίνουν ινσουλίνη με γλυκοζο-εξαρτώμενο τρόπο.

(iii) Η ομάδα 4 καλλιεργήθηκε για 14 ημέρες χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η ομάδα 4B αύξησε στατιστικώς σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης σε σχέση με την ομάδα 4A ($p<0.001$). Τα κύτταρα ρυθμίζουν την έκκριση ινσουλίνης σύμφωνα με τα επίπεδα γλυκόζης και εκκρίνουν σημαντικά περισσότερη ινσουλίνη όταν η συγκέντρωση γλυκόζης αυξηθεί από τα 100 mg/dl στα 250 mg/dl.

2. Η διαφορά μεταξύ των ομάδων 2A (επτά ημέρες καλλιέργεια) και 3A (14 ημέρες καλλιέργεια) δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.191$). Επομένως η διαφορά στη χρονική διάρκεια των καλλιέργειών και στο καλλιεργητικό μέσο δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά στην έκκριση ινσουλίνης στα 100 mg/dl γλυκόζη.

3. Η διαφορά μεταξύ της ομάδας 2B (επτά ημέρες καλλιέργεια) και 3B (14 ημέρες καλλιέργεια) είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.008$). Άρα, η διάρκεια της καλλιέργειας και η αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης στα 250 mg/dl γλυκόζης.

4. Η παραγωγή ινσουλίνης δεν είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ των ομάδων 3A (καλλιέργεια με παρουσία αυξητικών παραγόντων) και 4A (απουσία αυξητικών παραγόντων) με $p=0.811$. Δηλαδή, οι αυξητικοί παράγοντες και η λιραγλουτιδίδη ούτε είναι απαραίτητοι για την κυτταρική διαφοροποίηση σε ινσουλινοπαραγωγά κύτταρα ούτε επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης.

Πίνακας 9. Στατιστική σύγκριση των αντίστοιχων ομάδων σύμφωνα με τα ερευνητικά ερωτήματα

Ερώτημα	Σύγκριση ομάδων	Στατιστική δοκιμασία	Στατιστική σημαντικότητα
1. Τα κύτταρα εκκρίνουν περισσότερη ινσουλίνη όταν η συγκέντρωση στο υπερκείμενο ανεβαίνει από τα 100 στα 250 mg/dl	(i) 2A και 2B	Parametric. Paired Samples t test	P=0.920
	(ii) 3A και 3B	Non parametric. Wilcoxon signed ranks test	P=0.492
	(iii) 4A και 4B	Parametric. Paired Samples t test	P<0.001
2. Η επέκταση του χρόνου καλλιέργειας από τις 7 έως τις 14 ημέρες και η αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου επηρεάζουν την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης στα 100 mg/dl γλυκόζης	2A και 3A	Non parametric. Mann-Whitney test for two independent Samples	P=0.191
3. Η επέκταση του χρόνου καλλιέργειας από τις 7 στις 14 ημέρες και η αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου επηρέασε την εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης στα 250 mg/dl γλυκόζης	2B και 3B	Parametric. Two independent Samples t test for equal variances (Levene test for equality of variances p=0.112)	P=0.008
4. Η παρουσία των αυξητικών παραγόντων στο υπερκείμενο αύξησε την εκκρινόμενη ινσουλίνη στατιστικώς σημαντικά	3A και 4A	Non parametric. Mann-Whitney test for two independent Samples	P=0.811

XXV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσφατες έρευνες αναδεικνύουν μία νέα ιδιότητα των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προγονικές μορφές, οι οποίες να ομοιάζουν μορφολογικά στα μεσεγχυματικά κύτταρα και στα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος και τα οποία να μπορούν να παράγουν ινσουλίνη.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ινσουλινο- παραγωγά κύτταρα και μεγιστοποιήθηκε η παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης. Για την αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης από τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε ένα ανθρώπινο ανάλογο παρατεταμένης δράσης του GLP-1 υποδοχέα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία, στην οποία χρησιμοποιήθηκε GLP-1 ανάλογο για την παραγωγή ινσουλίνης από τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα. Όταν σχεδιάστηκε η μελέτη (2010) δεν ήταν γνωστή, ακόμα, η ύπαρξη υποδοχέων GLP-1 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων. Η ύπαρξη υποδοχέων GLP-1 έγινε γνωστή το 2014. (125)

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από υγιείς ενήλικες, το οποίο περιείχε το ένζυμο DPP4, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του ενδογενώς παραγόμενου GLP-1. Σε μελλοντική μελέτη πιθανόν να είναι απαραίτητη η χρήση αναστολέα του ενζύμου DPP4 για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα. Ωστόσο, είναι η πρώτη μελέτη, η οποία παρουσιάζει τόσο υψηλά επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης από καλλιέργειες ανθρώπινων μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα μονοκύτταρα αποκτούν την καινούργια ιδιότητα της παραγωγής ινσουλίνης και δεν τροποποιούν μια ιδιότητα που ήδη έχουν. Επιπλέον, παρουσιάζεται ένας νέος τρόπος διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε ινσουλινοεκκριτικά κύτταρα. Για να επιτευχθεί η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων γίνεται καλλιέργεια μαζί με λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια. Περιγράφεται η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων και η παραγωγή ινσουλίνης σε καλλιέργεια χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Απεικονίζεται η πλαστικότητα των μονοκυττάρων κατά τη διαφοροποίησή τους. Τα μονοκύτταρα πιθανώς είναι ικανά να γίνουν πολυδύναμα κύτταρα.

Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μελέτης είναι το γεγονός πως τα πειράματα έγιναν σε αυστηρά καθορισμένες συνθήκες *in vitro*. Τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα με κάθε δότη αίματος. Με αυτό τον τρόπο αποδεικνύεται πως μόνο τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για όλα τα αποτελέσματα.

Το GLP-1 είναι ένας παράγοντας που επιφέρει την αίσθηση του κορεσμού

στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης είναι ένας ισχυρός παράγοντας που ωθεί την παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης στα παγκρεατικά β κύτταρα. Οι δράσεις του είναι χρονικά περιορισμένες εξαιτίας της αποδόμησής του από τη δράση του ενζύμου διπεπτιδυλ-πεπτιδάση 4 (DPP4). Επιπρόσθετα, το GLP-1 έχει δράση κυτταροκίνης επειδή προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κυτταροπροστασία. Ρυθμίζει κυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια που συνδέονται απευθείας με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Προάγει τον πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών β κυττάρων, την ωρίμανσή τους και την αναγέννησή τους.

Οι δράσεις του GLP-1 οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη μεταγραφή του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα της επιδερμίδας (Epidermal Growth Factor) και του αντίστοιχου υποδοχέα. Έχει ανακοινωθεί ότι προάγει την αύξηση της μάζας των παγκρεατικών β κυττάρων και αναστέλλει την απόπτωσή τους in vivo σε διαβητικά ποντίκια. Η περίοδος ημιζωής του GLP-1 είναι περίπου 2 λεπτά μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο μόρια τα οποία δεν υπόκεινται σε γρήγορη αποδόμηση. (121)

Η λιραγλουτίδη είναι ένα μακράς δράσης ανάλογο του ανθρώπινου GLP-1 με 97% ομοιότητα με το ανθρώπινο μόριο και την προσθήκη λιπόφιλου υποστρώματος. Τα μόρια της λιραγλουτίδης προστατεύονται από τη διάσπαση με τρεις τρόπους:

1. Δημιουργούν μεταξύ τους χημικούς δεσμούς με αποτέλεσμα να γίνονται επταμερή και να απορροφώνται αργά στη συστηματική κυκλοφορία.
2. Συνδέονται με την αλβουμίνη.
3. Το μόριο έχει μεγάλη σταθερότητα και δεν διασπάται εύκολα από τη διπεπτιδυλ-πεπτιδάση-4 (DPP-4).

Μόνο το ελεύθερο τμήμα της λιραγλουτίδης είναι βιολογικά ενεργό. (151)

Στην έναρξη της διατριβής υπήρχαν διαθέσιμα δύο GLP-1 ανάλογα, η εξενατίδη και η λιραγλουτίδη. Προτιμήθηκε η χρήση της λιραγλουτίδης στα πειράματα για τρεις λόγους:

1. Πρώτον, η λιραγλουτίδη είναι ανάλογο του ανθρώπινου GLP-1, ενώ η εξενατίδη είναι ανάλογο του GLP-1 στο ερπετό Gila Monster Lizard.
2. Δεύτερον, η λιραγλουτίδη είναι παρατεταμένης δράσης ακετυλο-GLP-1 ανάλογο, ενεργεί ως πλήρης αγωνιστής προς τον GLP-1 υποδοχέα και είναι κλινικά αποτελεσματικότερη από την εξενατίδη.
3. Τρίτον, η ασφάλεια της χρήσης της λιραγλουτίδης στους ανθρώπους έχει τεκμηριωθεί μέσα από πολυκεντρικές μελέτες.(106)

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη δεν υπήρχε σαφής αναφορά για την ύπαρξη υποδοχέων των ινκρετινών GLP-1 στα μονοκύτταρα. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκε η ύπαρξη υποδοχέων στα μονοκύτταρα το έτος 2014. (121, 125)

Το GLP-1 επιβραδύνει τη διαδικασία της αθηρογένεσης. Οι αγωνιστές του GLP-1 (GLP-1 agonists) αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου κυκλικού AMP (cAMP). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνονται διαδοχικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο είναι αγγειοδιασταλτική ουσία. Επίσης οι αγωνιστές του GLP-1 αυξάνουν τους υποδοχείς του GLP-1 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και ταυτόχρονα μειώνουν τους υποδοχείς Scavenger receptors CD36. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη της οξειδωμένης LDL από τα μακροφάγα και την αναστολή του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων. Οι υποδοχείς Scavenger receptors SR-A και LOX-1 δεν επηρεάζονται από το GLP-1. Επομένως η χορήγηση του GLP-1 δεν μπορεί να σταματήσει πλήρως τη διαδικασία αθηρογένεσης in vivo. (121)

Οι μεταβολές που συμβαίνουν στην καλλιέργεια των μονοκυττάρων:

1. Τα μονοκύτταρα είναι τα κύτταρα που προσκολλώνται στην πλαστική επιφάνεια του τρυβλίου της καλλιέργειας, αλλάζουν τους δείκτες επιφανείας τους (CD markers), αλλάζουν μέγεθος και μορφολογία. Η αύξηση των δεικτών επιφανείας συμβαδίζει πάντα με την αύξηση του δείκτη των μονοκυττάρων CD14. Και ανάποδα, η αύξηση του δείκτη CD14 είναι γραμμικά ανάλογη με την αύξηση των υπολοίπων δεικτών επιφανείας, είτε ώριμους είτε άωρους. Αυτή η αναλογική αλλαγή των δεικτών με τον δείκτη CD14 υπονοεί ότι τα κύτταρα έχουν μονοκυτταρική προέλευση.
2. Τα μονοκύτταρα αναπτύσσουν άωρους δείκτες επιφανείας (CD33, CD34) και την ίδια στιγμή διατηρούν και τους αρχικούς δείκτες ταυτότητας (CD14, CD45).
3. Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται και αναπτύσσουν άξονες και αποφυάδες. Δημιουργούν κυτταρικές συνδέσεις σαν να προσπαθούν να χτίσουν έναν νέο ιστό μέσα στο καλλιεργητικό τρυβλίο.
4. Μικρά κυστίδια στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιέχουν πιθανότατα ινσουλίνη (Εικόνα 49).
5. Τα λεμφοκύτταρα διατηρούν την αρχική τους μορφολογία σε όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών, με πιθανή εξαίρεση τα natural killer cells CD16+, τα οποία αυξάνουν σε μέγεθος αλλά διατηρούν πάντα

το στρογγυλό τους σχήμα.

6. Τα κύτταρα που καλλιεργούνται με την παρουσία αυξητικών παραγόντων και λιραγλουτίδης δεν είναι ικανά να αυξήσουν την έκκριση ινσουλίνης σύμφωνα με την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης του υπερκειμένου. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην έκκριση ινσουλίνης ανάμεσα στις καλλιέργειες στην ίδια συγκέντρωση γλυκόζης.
7. Από την άλλη μεριά, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε απουσία αυξητικών παραγόντων και λιραγλουτίδης μπορούν να ρυθμίσουν την έκκριση της ινσουλίνης ανάλογα με τα επίπεδα της γλυκόζης του υπερκειμένου. Δηλαδή τα κύτταρα έχουν αποκτήσει ορισμένες από τις ιδιότητες των παγκρεατικών κυττάρων. Δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην εκκρινόμενη ινσουλίνη μεταξύ των καλλιεργειών. Δηλαδή, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει έναν γλυκοζο-εξαρτώμενο μηχανισμό έκκρισης της ινσουλίνης.
8. Από την ανάλυση των μορφολογικών και εργαστηριακών δεδομένων προκύπτει ότι τα κύτταρα δεν έχουν μετατραπεί σε παγκρεατικά κύτταρα.

Η παραγωγή της ινσουλίνης και η έκκρισή της είναι πιθανόν αυθόρμητη, καθώς τα κύτταρα αποκτούν άωρα χαρακτηριστικά. Ίσως τα κύτταρα να χρησιμοποιούν την ινσουλίνη ως αυξητικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους. Ορισμένα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα ομοιάζουν μορφολογικά με μεσεγχυματικά κύτταρα και έχουν στην κυτταρική τους μεμβράνη τον υποδοχέα CD34+, ο οποίος συναντάται σε άωρες μορφές λευκοκυττάρων. Η εκκρινόμενη ινσουλίνη πιθανότατα συμβάλλει στην περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων προς πολυδύναμα κύτταρα. Η εξωγενής χορήγηση αυξητικών παραγόντων δεν είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την έκκριση ινσουλίνης. Αυτό το εύρημα υποστηρίζεται και από νεότερα δεδομένα. (152)

Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μία τάση για μεγαλύτερη παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης στις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν αυξητικοί παράγοντες και λιραγλουτίδη στα 100 mg/dl γλυκόζης. Η σύγκριση καλλιεργειών με παρουσία και με απουσία αυξητικών παραγόντων πιθανόν να αποκάλυπτε μία σημαντική διαφορά στην έκκριση ινσουλίνης, αν η διάρκεια των καλλιεργειών επεκτεινόταν πέρα από τις 14 ημέρες.

Η βιλνταγλιπτίνη είναι ένας αναστολέας του DPP4, του ενζύμου που διασπά το GLP-1. Άρα όταν προστίθεται στις καλλιέργειες η βιλνταγλιπτίνη, το GLP-1 παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ενεργό. Στη δική μας μελέτη δεν προστέθηκε DPP4-αναστολέας. Αυτή θα μπορούσε να είναι η αιτία για τη μειωμένη δράση της λιραγλουτίδης και τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα. Ο ορός αίματος που χρησιμοποιήθηκε για τα

πειράματα περιείχε DPP-4 ένζυμο. Αυτό σημαίνει ότι η λιραγλουτιδίνη που υπήρχε στο υπερκείμενο των καλλιέργειών διασπάστηκε ταχύτερα σε σχέση με τις μελέτες της βιβλιογραφίας που προσέθεσαν βιλνταγλιπτίνη. (153)

Η επίδραση της λιραγλουτιδίνης απεικονίζεται στη μορφολογία των κυττάρων της παρούσας μελέτης. Τα μονοκύτταρα δεν εξελίσσονται μορφολογικά προς μακροφάγα, αλλά προς κύτταρα με μακριές αποφυάδες που μοιάζουν με τα μεσεγχυματικά κύτταρα.

Δεν υπάρχει ένδειξη που να υποστηρίζει ότι τα κύτταρα μετατράπηκαν σε παγκρεατικά κύτταρα. Τα κύτταρα παραμένουν κύτταρα του αίματος, όμως πιθανότατα γίνονται πιο πολυδύναμα. Τα κύτταρα παράγουν ινσουλίνη, διότι η ινσουλίνη είναι αυξητικός παράγοντας και συμβάλλει στην ανάπτυξή τους. Πιθανότατα δεν παράγουν ινσουλίνη τα κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί σε μακροφάγα. Ενδεχομένως η ινσουλίνη παράγεται μόνο από τα κύτταρα που έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά προγονικών μορφών.

Διαπιστώνεται ότι στην αρχή του πειράματος το αρχικό καλλιεργητικό υλικό δεν περιέχει ινσουλίνη σε μετρήσιμο ποσό και τα κύτταρα (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) δεν παράγουν ινσουλίνη κατά την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης.

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα κύτταρα κατά την 7η ημέρα της καλλιέργειάς τους **εκκρίνουν** ινσουλίνη. Μετά την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, ορισμένες καλλιέργειες εκκρίνουν επιπρόσθετη ινσουλίνη και αυξάνουν τη συγκέντρωσή της, ενώ άλλες καλλιέργειες καταναλώνουν ινσουλίνη και μειώνουν τη συγκέντρωσή της στο υπερκείμενο. Κατά μέσο όρο, οι καλλιέργειες περιέχουν στα 2 ml του υπερκειμένου τους **10,32 μU** ινσουλίνης πριν τη χορήγηση γλυκόζης. Περιέχουν συνολικά 10,08 μU μετά τη χορήγηση γλυκόζης. Αυτό σημαίνει ότι κατά μέσο όρο κατανάλωσαν μικρή ποσότητα ινσουλίνης ως απάντηση στην αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης. Είναι αξιοσημείωτο και το εύρος του ποσοστού μεταβολής της ινσουλίνης του υπερκειμένου από -58,69% έως +595,52%, ανάλογα με το πηγαδάκι.

Τη 14η ημέρα της καλλιέργειας τα κύτταρα **εκκρίνουν** ινσουλίνη, κατά μέσο όρο 17,03 μU, και είναι περισσότερη σε σχέση με τα ίδια κύτταρα της 7ης ημέρας. Μετά την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στα 250 mg/dl, ορισμένες καλλιέργειες εκκρίνουν ινσουλίνη, ενώ άλλες την καταναλώνουν, όπως συνέβαινε και την 7^η ημέρα καλλιέργειας. Όμως κατά μέσο όρο παράγουν επιπλέον ινσουλίνη και φτάνει η ποσότητά της στο υπερκείμενο στα **19,45 μU**. Αξιοσημείωτες είναι οι αποδόσεις των κυττάρων μετά την προσθήκη γλυκόζης. Το ποσοστό μεταβολής της ποσότητας ινσουλίνης κυμαίνεται από -56,06% έως +370,74%.

Έγινε έλεγχος της περιεκτικότητας των κυττάρων της καλλιέργειας σε

ινσουλίνη τη 14η ημέρα καλλιέργειας. Πρώτα αφαιρέθηκε το σύνολο του υπερκείμενου από το πηγαδάκι. Στη συνέχεια αποκολλήθηκαν τα κύτταρα με cell scraping. Τα κύτταρα και μόνο τοποθετήθηκαν σε 1 ml water for injection που είναι τελείως υπότονο και μπορεί να προκαλέσει τη λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη βαθιά κατάψυξη -70 βαθμών Κελσίου και αυτό προκάλεσε την καταστροφή όλων των κυττάρων. Μετά από το ξεπάγωμα των δειγμάτων έγινε η μέτρηση της ινσουλίνης. Τα κύτταρα τη 14η ημέρα καλλιέργειας με παρουσία αυξητικών παραγόντων περιέχουν κατά μέσο όρο 17,96 μU ινσουλίνης (5 δείγματα). Τα κύτταρα της 14ης ημέρας καλλιέργειας χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων περιέχουν 4,12 μU ινσουλίνης (2 δείγματα).

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 14 ημέρες μόνο με RPMI και ορό παρατηρούμε ότι και αυτά **εκκρίνουν** ινσουλίνη. Η ποσότητα που περιέχει αρχικά η καλλιέργεια είναι **15,05 μU** κατά μέσο όρο. Μετά την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, τα κύτταρα εκκρίνουν ινσουλίνη και αυξάνουν σταθερά την περιεκτικότητα του υπερκείμενου σε όλα τα πηγαδάκια. Κατά μέσο όρο η ινσουλίνη αυξάνει στα **22,81 μU** . Το ποσοστό μεταβολής της περιεκτικότητας ινσουλίνης στο υπερκείμενο κυμαίνεται από +8,17% έως +131,57%.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δύο ακόμη μελέτες που κατάφεραν να διαφοροποιήσουν τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Υπάρχει και μία τρίτη μελέτη, η οποία κατάφερε να διαφοροποιήσει μονοκύτταρα πιθήκου προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη.

1. Στην πρώτη μελέτη που έγινε το 2005 οι Runhke και συνεργάτες κατάφεραν τα εξής: τα διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από καλλιέργεια 10-13 ημερών **περιέχουν** 0,87 ng ινσουλίνης /1000 mg ολικής πρωτεΐνης (ή 0,87 $\mu\text{g}/\text{mg}$) σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (100 mg/ml). Επίσης περιέχουν 0,119 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ινσουλίνης σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (400 mg/ml).

Ένα κύτταρο έχει χονδρικά μάζα 1 ng. Τα 5×10^5 κύτταρα έχουν μάζα $5 \times 10^5 \text{ ng} = 500 \text{ ng}$. Επομένως **10^5 κύτταρα** σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης **περιέχουν** 0,87 μg ινσουλίνης ανά mg κυττάρων $\times 500 \text{ mg}$ συνολική μάζα κυττάρων $= 435 \text{ ng} = 0,435 \text{ ng}$ ή **10,8 μU ινσουλίνης**. Στην υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης περιέχουν 0,119 μg $\times 500 \text{ mg} = 595 \text{ ng} = 0,595 \text{ ng}$ ή **14 μU** . Μετατρέπουμε τα μg ινσουλίνης σε μU με τον τύπο $1 \mu\text{U}/\text{ml} = 0.04 \text{ ng}/\text{ml}$, $1 \text{ ng}/\text{ml} = 25 \mu\text{U}$. Σε αυτή τη μελέτη δεν μετρίεται η ποσότητα ινσουλίνης ως απόλυτος αριθμός, αλλά μετρίεται ως ποσοστό της ολικής πρωτεΐνης που περιέχουν τα κύτταρα. Επίσης δεν μετρίεται η έκκριση ινσουλίνης αλλά η περιεκτικότητα των κυττάρων σε ινσουλίνη. Δεν αναφέρεται πόσα κύτταρα υπάρχουν στις

καλλιέργειες και παρήγαγαν αυτό το αποτέλεσμα. Η αναγωγή έγινε στα 10^5 κύτταρα για σύγκριση με τις υπόλοιπες μελέτες. (79)

2. Στη δεύτερη μελέτη μετρήθηκε η **έκκριση** της ινσουλίνης. Δυστυχώς δεν αναφέρεται ο αριθμός των κυττάρων που εκκρίνει την ινσουλίνη. Μόνο αναφέρεται ότι οι καλλιέργειες **ξεκίνησαν με 2×10^7 κύτταρα** και η διάρκεια των καλλιέργειών ήταν 13 ημέρες. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με 180 mg/dl γλυκόζης συγκέντρωση στο υπερκείμενο. Στις μισές καλλιέργειες προστέθηκε για **δύο ώρες** γλυκόζη με τελική συγκέντρωση 500 mg/dl. Η έκκριση ινσουλίνης είναι πολύ μικρή. Στη χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης τα κύτταρα παράγουν 1 mU/Lit= 1 μ U/ml ινσουλίνης και στην υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης 4 μ U/ml ινσουλίνης. Δεν αναφέρεται ο όγκος του υπερκειμένου. Συνήθως είναι 2ml. Άρα η εκκρινόμενη ποσότητα ινσουλίνης κυμαίνεται από **2 έως 8 μ U**. Επίσης τα πειράματα επαναλήφθηκαν μόνο τρεις φορές. (154)
3. Η τρίτη μελέτη αναφέρεται σε μονοκύτταρα πιθήκων-μπαμπούινων. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο διαφοροποίησης του Ruhnke. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 14 ημέρες. Βρέθηκε ότι μετά από 12 ώρες παραμονής των κυττάρων σε συγκέντρωση γλυκόζης 100 mg/dl τα κύτταρα **περιέχουν** 6.320-12.969 μ U ινσουλίνης / 1 εκατομμύριο κύτταρα. Όταν γίνεται αναγωγή στα **10^5 κύτταρα** τότε η ποσότητα ινσουλίνης που περιέχουν τα κύτταρα είναι από **632 μ U έως 1.612 μ U**. Αυτή η ποσότητα ινσουλίνης είναι τεράστια. Η μέτρησή της έγινε με μέθοδο ELISA για ανθρώπους, ενώ τα κύτταρα ήταν από πίθηκο. Παράλληλα, αναφέρεται ότι 10^5 ανθρώπινα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα περιέχουν 341 μ U ινσουλίνης. Δεν μελετήθηκε αν υπάρχει έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα. (152)
4. Στην παρούσα διατριβή τα διαφοροποιημένα ανθρώπινα μονοκύτταρα καλλιεργούνται για 14 ημέρες. Τελικά **εκκρίνουν από 15 έως 17 μ U ινσουλίνη/ 10^5 κύτταρα** σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης 100 mg/dl. Επίσης, οι καλλιέργειες εκκρίνουν **19 έως 22 μ U ινσουλίνης / 10^5 κύτταρα** σε συγκέντρωση γλυκόζης 250 mg/dl. Η έκκριση ινσουλίνης αυξήθηκε κατά μέσο όρο **7.76 μ U** (0.28 ng) ανά 10^5 κύτταρα μέσα **σε μία ώρα**. Η **περιεκτικότητα των κυττάρων σε ινσουλίνη κυμαίνεται από 4 μ U έως 17 μ U / 10^5 κύτταρα**. Άρα η παρούσα διατριβή ανακοινώνει την υψηλότερη έκκριση ινσουλίνης από ανθρώπινα μονοκύτταρα. Επίσης κατάφερε να προκαλέσει γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης και ανακοινώνει την υψηλότερη έκκριση ινσουλίνης μέσα σε μία ώρα. (155)

Στη δική μας μελέτη προστέθηκε 1 μg λιραγλουτίδης/ 3 μέρες, χωρίς την προσθήκη αναστολέα του ενζύμου διπεπτιδυλ-πεπτιδάσης-4 (DPP-4). Στις άλλες μελέτες που παρήγαγαν ινσουλίνη από μονοκύτταρα *in vitro* επίσης δεν έγινε χρήση των αναστολέων του ενζύμου διπεπτιδυλ-πεπτιδάσης-4 (DPP 4). Στη δική μας μελέτη ο πληθυσμός είναι μικτός και αποτελείται από μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια. Στις άλλες μελέτες ο πληθυσμός των μονοκυττάρων επίσης ήταν μικτός, καθώς χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος απομόνωσης με ficoll-raque. Στη δική μας μελέτη η διαφοροποίηση των κυττάρων προς μακροφάγα παρατηρήθηκε μόνο σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων. Τα μακροφάγα εκφράζουν μικρό αριθμό υποδοχέων GLP-1 σε σχέση με τα μονοκύτταρα.

Στις καλλιέργειες βρίσκεται και ένα μικρό ποσοστό αιμοπεταλίων, το οποίο δεν ήταν εφικτό να διαχωρισθεί από το ίζημα των κυττάρων κατά την απομόνωση. Τα αιμοπετάλια δεν παράγουν ινσουλίνη. Αντίθετα, χρησιμοποιούν την ινσουλίνη για να επάγουν τη σύνδεση κυρίως των GLUT3 υποδοχέων με την κυτταρική μεμβράνη και να προσλάβουν έτσι τη γλυκόζη. Άρα, μπορεί να μειώσουν ελαφρώς την παραγόμενη ποσότητα ινσουλίνης στα τρυβλία. Την 7η και 14η ημέρα καλλιέργειας τα αιμοπετάλια ήταν ελάχιστα στις καλλιέργειες. Απομακρύνθηκαν από την καλλιέργεια με τις αλλαγές του θρεπτικού υλικού.

Ο GLUT3 είναι παρών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (15%) και σε ενδοκυττάρια κοκκία (85%) των αιμοπεταλίων. Η θρομβίνη και η ινσουλίνη ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση B και επάγουν πρόσληψη γλυκόζης. Η πρωτεϊνική κινάση προκαλεί την ένωση των κυτταροπλασματικών κοκκίων GLUT3 με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και διπλασιάζεται έτσι η πρόσληψη γλυκόζης. Σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης (5mM) η διέγερση για πρόσληψη γλυκόζης από την ινσουλίνη και τη θρομβίνη αναστέλλεται. (156)

Τα αιμοπετάλια φαίνεται ότι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και στη διευκόλυνση της σύνδεσής τους με τον πυθμένα του πηγαδιού. Όταν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια από λοίμωξη ή από εμβολιασμό, τότε σχηματίζουν ευκολότερα σύμπλοκα με τα λευκά αιμοσφαίρια. Με αυτό τον τρόπο, τα λευκά αιμοσφαίρια αυξάνουν την ικανότητά τους να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των αγγείων. Τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να τροποποιούν και τα αντιγόνα επιφανείας των μονοκυττάρων και να τα κατευθύνουν από CD14+ CD16- προς CD14+ CD16+. (157)

Το περιβάλλον της καλλιέργειας, τα αιμοπετάλια και τα λεμφοκύτταρα είναι χρήσιμα για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα συνεργάζονται και δρουν ως ενιαία οντότητα *in vivo*. Με αυτό τον τρόπο το ανοσιακό σύστημα λειτουργεί ομαλά. Παρόμοια συνεργασία επιτυγχάνεται και *in vitro*. Φαίνεται ότι τα λεμφοκύτταρα

υποστηρίζουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Πιθανόν, τα CD16 θετικά λεμφοκύτταρα έχουν ρόλο να ενεργοποιήσουν τα προσκολλημένα μονοκύτταρα.

Οι καλλιέργειες περιέχουν επίσης μία μικρή ποσότητα αιμοπεταλίων, ιδίως στην αρχή της καλλιέργειας. Φαίνεται ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια βοηθούν τα μονοκύτταρα να προσκολληθούν στις πλαστικές επιφάνειες του τρυβλίου. Τα αιμοπετάλια δεν παράγουν ινσουλίνη. Αντίθετα, καταναλώνουν ινσουλίνη μέσω των GLUT3 υποδοχέων τους. Έτσι μειώνουν την ποσότητα ινσουλίνης στο υπερκείμενο.

Συμπερασματικά, κάθε κύτταρο στην καλλιέργεια αλληλεπιδρά με τα γειτονικά του. Όλα μαζί τα γειτονικά κύτταρα παράγουν πρωτεΐνες και ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον τους με μοναδικό τρόπο. Παράγουν πολλές πρωτεΐνες για να κατορθώσουν να διαφοροποιηθούν και αυτός ο μηχανισμός είναι ακόμη άγνωστος. (156, 157)

Στην παρούσα μελέτη δεν είναι αυτοσκοπός να απομονώσουμε πλήρως τα μονοκύτταρα. Ο στόχος είναι να μπορέσουμε να διαφοροποιήσουμε τα μονοκύτταρα προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Γι' αυτό τον λόγο είναι χρήσιμο να συμπεριλάβουμε στην καλλιέργεια μικρή ποσότητα λεμφοκυττάρων και μικρή ποσότητα αιμοπεταλίων, ώστε τα κύτταρα να συνεργαστούν ως ομάδα και να παραγάγουν τις απαραίτητες ουσίες για τη διαφοροποίησή τους. Για να γίνει πετυχημένη η διαφοροποίηση των κυττάρων, χρειάζονται πολύ περισσότερες ουσίες από αυτές που χορηγήθηκαν εξωγενώς. Αυτό σημαίνει ότι τα ίδια τα κύτταρα παρήγαγαν ουσίες που προώθησαν τη διαφοροποίησή τους.

Το περιβάλλον των κυττάρων περιέχει κυτταροκίνες οι οποίες ρυθμίζονται από τα ίδια τα κύτταρα. Για να γίνει κατανοητή η συνεισφορά των κυττάρων στην έκκριση των κυτταροκινών, μετρήθηκαν 48 κυτταροκίνες σε συγκαλλιέργειες μονοκυττάρων και CD4+ λεμφοκυττάρων και συγκρίθηκαν με καλλιέργειες μονοκυττάρων χωρίς λεμφοκύτταρα. Όταν τα κύτταρα συγκαλλιεργούνται, οι κυτταροκίνες στο υπερκείμενο της καλλιέργειας *in vitro* δεν έχουν καμία σχέση με τις κυτταροκίνες που βρίσκονται στον ορό του αίματος *in vivo*. Ορισμένες κυτταροκίνες αυξάνονται και άλλες μειώνονται. Παράδειγμα κυτταροκινών που αυξάνονται *in vitro* είναι η IP-10 και η Mig, οι οποίες αυξάνονται ανάλογα με τα επίπεδα ιντερφερόνης- γ και TNF- α στο υπερκείμενο. Προάγουν τη χημειοτακτική μετανάστευση των λεμφοκυττάρων, αυξάνουν την προσκόλληση μέσω ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης και αλλάζουν τη δομή του κυτταροσκελετού. (158)

Οι πραγματικοί μάρτυρες των πειραμάτων είναι τα μονοκύτταρα που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα. Γι' αυτό τον λόγο, έγινε η λήψη του δείγματος για την ELISA αμέσως μετά την απομόνωση των μονοκυττάρων, ως μαρτύρων, και στη συνέχεια προχώρησε το πείραμα με τα ίδια κύτταρα. Φυσικά δεν διαπιστώθηκε έκκριση ινσουλίνης από τα μονοκύτταρα του

περιφερικού αίματος.

Συμπερασματικά, τα μονοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που παράγουν επαρκή ποσότητα ινσουλίνης για να σταθεροποιήσουν τη γλυκόζη στο αίμα. Η μέση έκκριση ινσουλίνης σε μία ώρα *in vitro* ήταν 7.76 μU ή 0.28 ng ανά 10^5 κύτταρα. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων (10^5) μπορεί να παράγει μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης. Για σύγκριση *in vivo*, ένας ενήλικας με 5 λίτρα αίματος έχει σε κατάσταση νηστείας 22.8 μU ή 0.912 ng ινσουλίνης στην αιματική κυκλοφορία. Άρα 4×10^5 διαφοροποιημένα μονοκύτταρα μπορούν θεωρητικά να παράγουν αρκετή ινσουλίνη για να καλύψουν τις ανάγκες ενός ενήλικα σε νηστεία. Άρα, τα μονοκύτταρα είναι υποψήφια κύτταρα για στρατηγικές αναπλήρωσης κυττάρων για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη στο μέλλον. (159)

Οι θεραπείες αντικατάστασης της μάζας των β κυττάρων παρέχουν νέα θεραπευτικά εργαλεία. Στη σημερινή εποχή, η αναπλήρωση των παγκρεατικών κυττάρων από ενήλικα ή εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έχει αυξημένο ενδιαφέρον. Όμως, είναι δύσκολο να βρεθούν αυτά τα κύτταρα και να καλλιεργηθούν. Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να δημιουργήσουν όγκους. (160)

Τα ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα είναι σπάνια *in vivo*. Είναι δύσκολο να διατηρηθεί η πολυδυναμία τους *in vitro*. Η αποθήκευσή τους σε βαθιά κατάψυξη έχει σημαντικό κόστος. Τα ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα είναι ασφαλή για χρήση *in vivo*. (161-164)

Η χρήση των μονοκυττάρων ως πολυδύναμων κυττάρων που μπορούν να αναπληρώσουν κυτταρικές λειτουργίες και ιστούς είναι μία πολλά υποσχόμενη ιδέα. Η παρούσα διατριβή φανερώνει ότι τα μονοκύτταρα μπορούν να παραγάγουν *in vitro* ινσουλίνη και ενδεχομένως μελλοντικά να αναπληρώσουν τις λειτουργίες των β κυττάρων του παγκρέατος. Επίσης, η μετατροπή τους σε κύτταρα με παρόμοιες ιδιότητες με τα πολυδύναμα κύτταρα αποτελεί ένα μεγάλο βήμα της ιατρικής επιστήμης και δίνει πολλές δυνατότητες θεραπείας. Πιθανότατα, τα μονοκύτταρα μπορούν να αποκτήσουν αωρότερους χαρακτήρες. Αυτή η πλαστικότητα δίνει ελπίδες ότι θα είναι εφικτή στο μέλλον η χρήση τους ως πηγή πολυδύναμων κυττάρων.

Τα μονοκύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπείες αναπλήρωσης κυττάρων ως αυτόλογα μοσχεύματα. Η μεγάλη πρόκληση είναι να διαφοροποιηθούν σε ινσουλινο-παραγωγά *in vitro* και στη συνέχεια να μεταμοσχευθούν *in vivo*. Αυτή η αυτόλογη μεταμόσχευση αποκλείει την ανοσολογική απόρριψη. Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι εύκολα προσβάσιμα. Βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στην αιματική κυκλοφορία. Δεν χρειάζονται αποθήκευση στην κατάψυξη, καθώς είναι πάντα διαθέσιμα με μία απλή αιμοληψία. Δεν θέτουν ηθικά διλήμματα,

όπως κάνουν τα εμβρυϊκά κύτταρα.

Τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα ομοιάζουν στα ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα. Τα μονοκύτταρα έχουν δυνατότητες και πλαστικότητα. Ίσως, τα μονοκύτταρα αποχωρίζονται τον μυελό των οστών και διασκορπίζονται στο σώμα με ρόλο και την επισκευή των ιστών. Πιθανόν να έχουν τον ίδιο ρόλο όπως έχουν και οι σπόροι στα φυτά. Τα μονοπύρηνια έχουν την αξιοσημείωτη ιδιότητα να εξελίσσονται μέσα στο κατάλληλο περιβάλλον σε κύτταρα CD34 θετικά και μπορούν να αποτελούν πηγή πολυδύναμων κυττάρων.

Από την άλλη πλευρά, η διαταραχή της λειτουργίας του ανοσιακού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών. Άρα η χρήση των διαφοροποιημένων μονοκυττάρων στους ανθρώπους πρέπει να γίνει με προσοχή. Είναι σημαντικό να γίνουν πειράματα που θα αποκαλύψουν αν είναι ασφαλή για χορήγηση in vivo. Θα πρέπει να ελεγχθεί αν τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα μπορούν να συμβάλλουν στην πρόκληση αυτοάνοσων ασθενειών ή όχι. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι δυσλειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων, των Th1 και Th2 λεμφοκυττάρων είναι υπεύθυνες για πλήθος αυτοάνοσων νοσημάτων. Η προοδευτική συστηματική σκλήρυνση, το σύνδρομο Sjogren, η δερματομυοσίτιδα, ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος είναι μερικές από τις σοβαρές ασθένειες που προκαλεί η δυσλειτουργία του ανοσιακού συστήματος.

Επομένως, δεν συστήνεται άμεσα η ευρεία χρήση των κυττάρων της παρούσας διατριβής in vivo σε ανθρώπους. Είναι αναγκαίο να γίνουν κλινικά πειράματα με μικρό αριθμό ανθρώπων, ώστε να εξακριβωθεί αν τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα είναι ασφαλή in vivo.

XXVI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ I

1. Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος με τη βοήθεια των λεμφοκυττάρων μπορούν να αποκτήσουν άωρους δείκτες στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης, ενώ ταυτόχρονα διατηρούν και τους αρχικούς δείκτες που προσδιορίζουν την ταυτότητά τους.
2. Τα μονοκύτταρα είναι ικανά να μετατραπούν σε κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη σε ικανοποιητικό βαθμό για τις ανάγκες ενός ενήλικα.
3. Είναι ικανά να παράγουν ινσουλίνη πιθανότατα όχι επειδή μετατράπηκαν σε β κύτταρα, αλλά διότι μετατράπηκαν σε πιο άωρα κύτταρα, τα οποία πλέον έχουν «ξεκλειδωμένα» γονίδια από διάφορους ιστούς του σώματος, συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού.
4. Δεν είναι απαραίτητο να προστεθούν εξωγενώς αυξητικοί παράγοντες για να προκαλέσουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα. Και μόνο το θρεπτικό υλικό, το περιβάλλον του τρυβλίου και η παρουσία των λεμφοκυττάρων είναι ικανά να προκαλέσουν αυτή την αλλαγή.
5. Οι εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες οδηγούν σε κύτταρα που έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα παραγωγής ινσουλίνης. Χρειάζονται δύο στάδια, τα οποία έχουν διάρκεια μιας εβδομάδας το καθένα. Γίνεται επίδραση διαφορετικών αυξητικών παραγόντων σε κάθε στάδιο. Πρώτο είναι το στάδιο της αποδιαφοροποίησης και δεύτερο το στάδιο της επαναδιαφοροποίησης.
6. Η απόκτηση νέων ιδιοτήτων από τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα είναι εφικτή μόνο εφόσον δημιουργηθούν συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων μέσω αποφυάδων και ο σχηματισμός υποτυπωδών δομών κυτταρικής επικοινωνίας.
7. Τα β κύτταρα χρησιμοποιούν τη βασική μεμβράνη και τα πρωτεϊνικά σήματα του ενδοθηλίου για να αναπτυχθούν. Φαίνεται ότι το ίδιο πρότυπο της βασικής μεμβράνης χρειάζονται και τα μονοκύτταρα για την εξέλιξή τους σε αωρότερα και πολυδύναμα κύτταρα και γι' αυτό δημιουργούν κυτταρικές συνδέσεις και δομές.
8. Όσο πιο έντονη είναι η έκφραση του δείκτη επιφανείας CD14 της κυτταρικής μεμβράνης των μονοκυττάρων, τόσο πιο έντονη είναι και η έκφραση των πιο ώριμων και άωρων δεικτών κατά τη διαφοροποίησή τους.

XXVII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ II

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης αποτελεί το σύγχρονο ιατρικό πρόβλημα με συχνότητα που διαρκώς αυξάνεται και εξακολουθεί να παραμένει ένα δυσεπίλητο πρόβλημα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

1. Η παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης από τα μονοκύτταρα.
2. Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε πολυδύναμα κύτταρα.
3. Η ακριβής μέτρηση της εκκρινόμενης ινσουλίνης, ώστε να διαπιστωθεί αν επαρκεί για τις ανάγκες ενός ενήλικα.
4. Η γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης.
5. Η μελέτη της επίδρασης της λιραγλουτίδης σε καλλιέργειες μονοκυττάρων. Αυτή η μελέτη εκπονείται για πρώτη φορά.

Αυτά που διαπιστώθηκαν από την παρούσα μελέτη είναι:

1. Επιβεβαιώθηκε ότι τα μονοκύτταρα μπορούν να παράγουν και να εκκρίνουν ινσουλίνη.
2. Τα μονοκύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε κύτταρα που ομοιάζουν μορφολογικά με πολυδύναμα κύτταρα και έχουν στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης υποδοχείς προγονικών κυττάρων, μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων και natural killer cells.
3. Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα έγινε με καινούργια μέθοδο σε σχέση με τη μέθοδο που περιγράφεται στη βιβλιογραφία.
4. Η έκκριση ινσουλίνης ανέρχεται πλέον σε επίπεδα που μπορεί να καλύψει τις ανάγκες του ανθρώπινου σώματος.
5. Παρατηρήθηκε γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες, χωρίς τα κύτταρα να μετατραπούν σε β κύτταρα. Οι συνθήκες περιλαμβάνουν την απουσία αυξητικών παραγόντων και λιραγλουτίδης. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα διατηρούν στην κυτταρική τους μεμβράνη τα αντιγόνα των μονοκυττάρων και γενικότερα των λευκών αιμοσφαιρίων.
6. Η προσθήκη λιραγλουτίδης στο θρεπτικό υλικό αύξησε την παραγωγή ινσουλίνης από τα διαφοροποιημένα κύτταρα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή συμβάλλει στην κατανόηση μηχανισμών που ενεργοποιούν και διαφοροποιούν τα μονοκύτταρα. Επίσης αναδεικνύει έναν νέο τρόπο παραγωγής ινσουλίνης που είναι πιο αποτελεσματικός από τον τρόπο που αναφέρεται μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Αυτές οι γνώσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων για τη θεραπεία του διαβήτη. Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ινσουλινο-παραγωγά κύτταρα *in vitro* και η επανεμφύτευσή τους στον ασθενή ενδεχομένως να επαναφέρει την ισορροπία στη γλυκαιμική ρύθμιση.

XXVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

(1) Εισαγωγή

Σε πρόσφατες έρευνες έχει παρατηρηθεί η ικανότητα των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος να διαφοροποιούνται προς κύτταρα με παρόμοια μορφολογία με τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Σκοπός της μελέτης είναι να ερευνηθεί η ικανότητα των μονοκυττάρων για διαφοροποίηση και παραγωγή ινσουλίνης *in vitro* μετά από τη χορήγηση ή μη αυξητικών παραγόντων και αναλόγου του Παρόμοιου-με-Γλουκαγόνο Πεπτιδίου-1. Η επίδραση του αναλόγου του παρόμοιου-με-γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων μελετάται για πρώτη φορά.

(2) Μέθοδοι

Μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από υγιείς δότες και καλλιεργήθηκαν για δεκατέσσερις ημέρες. Στις περισσότερες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν αυξητικοί παράγοντες και λιραγλουτίδη για να επαγάγουν τη διαφοροποίηση προς παγκρεατικά κύτταρα. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι: ο αυξητικός παράγοντας των μονοκυττάρων, η ιντερλευκίνη 3, ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων και ο αυξητικός παράγοντας των επιδερμικών κυττάρων. Οι υπόλοιπες καλλιέργειες έγιναν μόνο με τη χρήση θρεπτικού υλικού RPMI (Roswell Park Memorial Institute culture medium) και ανθρώπινου ορού αίματος.

Τα επίπεδα ινσουλίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοφθορισμού. Οι μετρήσεις έγιναν στην έναρξη των καλλιεργειών, στις επτά και στις δεκατέσσερις ημέρες. Η κυτταρική μορφολογία παρατηρήθηκε με το οπτικό και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Έγινε ιστολογική χρώση των κυττάρων με May Grunwald-Giemsa χρώση. Οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής στις επτά και δεκατέσσερις ημέρες καλλιέργειας. Η στατιστική ανάλυση έγινε με παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμασίες, ανάλογα αν τα δείγματα ακολουθούν την κανονική κατανομή ή όχι.

(3) Αποτελέσματα

Τα μονοκύτταρα ήταν ικανά να παράγουν και να εκκρίνουν υψηλά επίπεδα ινσουλίνης ύστερα από επτά ημέρες σε καλλιέργεια. Περαιτέρω αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης παρατηρήθηκε έπειτα από δεκατέσσερις ημέρες σε καλλιέργεια. Τα κύτταρα ήταν ικανά να διαφοροποιούνται και να συνθέτουν ινσουλίνη, ακόμη και όταν δεν είχαν προστεθεί αυξητικοί παράγοντες στο καλλιερητικό υλικό. Η παραγωγή ινσουλίνης δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των καλλιεργειών που καλλιεργήθηκαν παρουσία αυξητικών παραγόντων-λιραγλουτίδης και των καλλιεργειών που καλλιεργήθηκαν απουσία αυξητικών παραγόντων. Τα διαφοροποιημένα

μονοκύτταρα συνδέονταν με τα γειτονικά τους με αποφυάδες. Η μορφολογία του συνόλου των κυττάρων έμοιαζε με τα μεσεγχυματικά, τα δενδριτικά και τα προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς. Τα κύτταρα διατήρησαν τους ώριμους υποδοχείς (CD14, CD45, CD16) στη βασική μεμβράνη τους και παράλληλα ανέπτυξαν προγονικούς υποδοχείς στην κυτταρική τους μεμβράνη (CD33, CD34, CD209).

(4) Συμπεράσματα

Τα μονοκύτταρα μπορούν να αποκτήσουν μορφολογικά χαρακτηριστικά των πολυδύναμων κυττάρων, όταν καλλιεργηθούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες *in vitro*. Η μελέτη μας έδειξε για πρώτη φορά ότι τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα μπορούν να συνθέσουν και να εκκρίνουν ινσουλίνη σε μεγάλη ποσότητα. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς αυξητικούς παράγοντες και λιραγλουτιδίη, σταθερά έκκριναν ινσουλίνη με γλυκοζο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης είναι εντυπωσιακή η οργάνωση των κυττάρων με τις κυτταρικές συνδέσεις στον πυθμένα των καλλιεργητικών τρυβλίων. Αντίστοιχες εικόνες *in vivo* σχηματίζουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα στον μυελό των οστών. Τα ινσουλινοπαραγωγά κύτταρα παρουσιάζουν ενδεχομένως κλινική χρησιμότητα, αφού μπορούν θεωρητικά να χρησιμοποιηθούν ως μόσχευμα σε θεραπείες αναπλήρωσης των νησιδίων του παγκρέατος.

XXIX. SUMMARY

(1) Introduction

Recent studies provide evidence that peripheral blood monocytes have the ability to differentiate to mesenchymal-like cells. The aim of the present study is to analyse the ability of cultured monocytes to de-differentiate and produce insulin *in vitro* using growth factors or not and a long acting analog of Glucagon-Like-Peptide-1. The effect of a long acting analog of Glucagon-Like-Peptide-1 to monocyte differentiation was studied for the first time.

(2) Methods

Peripheral blood monocytes were isolated from healthy donors and cultivated for fourteen days. Growth factors and liraglutide were used to induce pancreatic differentiation in most of the cultures. The growth factors were: monocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. The rest of the cultures were cultivated only with nutrient medium RPMI and human serum.

Insulin levels were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay. Measurements took place at the beginning of the cultures, on the seventh day and on the fourteenth day. Cellular morphology was observed using optical and electron microscopy. Cells were stained with May Grunwald-Giemsa dye. Cell membrane receptors were detected by flow cytometry. Statistical analysis was performed using parametric and non parametric statistical tests, depending on the normality of the distribution of the samples.

(3) Results

Monocytes were able to synthesize and excrete high levels of insulin after seven days in culture. A further increase in the excretion of insulin was observed after fourteen days. Cells were also able to de-differentiate and synthesize insulin, even if no growth factors and liraglutide were added in the culture medium. The production of insulin is not statistically different between the cultures cultivated in the presence of growth factors and liraglutide and the cultures cultivated in the absence of growth factors. Differentiated monocytes were connected to neighbouring cells with axons. The morphology of the whole resembled the morphology of mesenchymal, dendritic and myeloid-progenitor cells. Cells retained their mature receptors (CD14, CD45, CD16) and simultaneously developed progenitor receptors on their membrane.

(4) Conclusion

Monocytes can acquire morphological properties of multipotent cells, when they are cultivated under specific conditions *in vitro*. Differentiated

monocytes are able to synthesize and excrete insulin in large amount. It is noteworthy the cells that were cultured in the absence of growth factors steadily excreted insulin in a glucose-dependent manner. Additionally, the organization of cells with the cellular connections in the bottom of the well is impressive. Mesenchymal cells in the bone marrow form equivalent pictures in vivo. Insulin-producing cells have probably clinical importance, as they can theoretically be used as graft for pancreatic tissue replacement therapies.

XXX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Rosenberg L, Vinik A. Trophic stimulation of the ductal-islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 1992; 321: 95-104.
- [2] Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes melitus. *Diabetologia.* 1992; 35: 193-201.
- [3] Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 2004; 429(6987): 41-46.
- [4] Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of Pancreatic β Cells from Intra-Islet Precursor Cells in an Experimental Model of Diabetes. *Endocrinology.* 2001; 142(11): 4956-68.
- [5] Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *New England Journal of Medicine.* 2000; 343(4): 230-238.
- [6] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2003; 52(1): 102-110.
- [7] Tyrberg B, Ustinov J, Otonkoski T, Andersson A. Stimulated Endocrine Cell Proliferation and Differentiation in Transplanted Human Pancreatic Islets. *Diabetes.* 2001; 50(2): 301-307.
- [8] Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733–42.
- [9] Straub SG, Sharp GWG. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2002; 18(6): 451-63.
- [10] Halban PA, Renold AE. Influence of glucose on insulin handling by rat islets in culture. A reflection of integrated changes in insulin biosynthesis, release, and intracellular degradation. *Diabetes.* 1983; 32(3): 254-61.
- [11] Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of Reduced Suppression of Glucose Production and Diminished Early Insulin Release in Impaired Glucose Tolerance. *New England Journal of Medicine.* 1992; 326(1): 22-29.

- [12] Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. Glucose Sensing in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*. 2001; 50(1): 1-11.
- [13] Henquin J-C. Pathways in Beta-Cell Stimulus-Secretion Coupling as Targets for Therapeutic Insulin Secretagogues. *Diabetes*. 2004; 53(suppl 3): S48-S58.
- [14] Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2728-35.
- [15] Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, et al. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic B-cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 4895-902.
- [16] Ishihara H, Wang H, Drewes LR, Wollheim CB. Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1621-9.
- [17] MacDonald MJ. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. *J Biol Chem* 1995; 270: 20051-8.
- [18] Lu D, Mulder H, Zhao P, Burgess SC, Jensen MV, Kamzolova S, et al. ^{13}C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2708-13.
- [19] MacDonald MJ. Elusive proximal signals of beta cells for insulin secretion. *Diabetes* 1990; 39: 1461-6.
- [20] Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 2000; 49: 718-726.
- [21] Seino S, Shibasaki T & Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2011; 121: 2118-2125.
- [22] Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β cell dysfunction in diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2016; 56(2): 33-54.

- [23] Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC & McGuckin MA. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunology and Cell Biology*. 2012; 90: 267-270.
- [24] Eizirik DL, Miani M & Cardozo AK. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia*. 2013; 56: 234-241.
- [25] Sun J, Cui J, He Q, Chen Z, Arvan P & Liu M. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Molecular Aspects of Medicine* 2015. 42: 105-118.
- [26] Menge BA, Schrader H, Breuer TG et al. Metabolic consequences of a 50% partial pancreatectomy in humans. *Diabetologia*. 2009; 5: 306-317.
- [27] Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β cell dysfunction in diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2016; 56(2): 33-54.
- [28] Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Reviews*. 2005 (19); 1: 29-38.
- [29] Wagers, A. J., Christensen, J. L., Weissman, I. L. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Gene Ther*. 2002; 9: 606-612.
- [30] Griffith, L. G., Naughton, G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*. 2002; 295: 1009-14.
- [31] Zhao Y, Glensne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 2426-31.
- [32] Jiang, Y., Jahngirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzales, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Blackstad, M., Du, J., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 1-9.
- [33] Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. & Scott, E. W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542-545.
- [34] Ying, Q.-L., Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002; 416: 545-548.

- [35] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
- [36] Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*. 2000; 6(3): 278-282.
- [37] Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(12): 8078-83.
- [38] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science*. 2001; 292(5520): 1389-94.
- [39] Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000; 49(2): 157-162.
- [40] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292: 1389-93.
- [41] Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 16105-10.
- [42] Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 998-1003.
- [43] Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-97.
- [44] Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 2003; 278: 31950-57.
- [45] Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7253-58.

- [46] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, et al. Neuro d-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 2003; 9: 596-603.
- [47] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7999-8004.
- [48] Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850.
- [49] Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Harnutal C, Skutelsky E et al. Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *PNAS*. 2005; 102(22); 7964-69.
- [50] Newgard CB. While tinkering with the beta-cell... metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association. 2001. *Diabetes* 2002; 51: 3141-50.
- [51] Faradji RN, Havari E, Chen Q, Gray J, Tornheim K, Corkey BE, et al. Glucose-induced toxicity in insulin-producing pituitary cells that coexpress GLUT2 and glucokinase. Implications for metabolic engineering. *J Biol Chem* 2001; 276: 36695-702.
- [52] Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, et al. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 2000; 290: 1959-62.
- [53] Limbert a, G. Pa"th a, F. Jakob b, J. Seufert. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007; 79(3): 389-399.
- [54] Weissman IL. Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. *Science*. 2000; 287(5457): 1442-46.
- [55] Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*. 2004; 84(5): 607-617.
- [56] Xiao-hong Wu, Cui-ping Liu, Kuan-feng Xu, Xiao-dong Mao, Jian Zhu, Jing-jing Jiang, Dai Cui, Mei Zhang, Yu Xu, Chao Liu. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3342-49.

[57] Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappo J, Tilton RG, et al. Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif.* 2007; 40(3): 367-380.

[58] Thiel H, Diem H, Haferlach T. In *Color, Atlas of Hematology*. Thieme, 2004, p46.

[59] Holland S, Gallin J. Disorders of granulocytes and monocytes. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th edition, McGraw-Hill, 2005, 55: p355.

[60] Daneman D, Zinman B, Elliott E, Bilan P, Klip A. Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from non-diabetic and IDDM subjects. *Diabetes.* 1992; 41: 227-234.

[61] Estrada DE, Elliott E, Zinman B, Poon I, Liu Z, Klip A, et al. Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: Studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism.* 1994; 43(5): 591-598.

[62] Dimitriadis G, Maratou E, Boutati E, Psarra A, Papasteriades C, Raptis S. Evaluation of Glucose Transport and Its Regulation by Insulin in Human Monocytes Using Flow Cytometry. *Cytometry.* 2005; 64: 27-33.

[63] Bonen A, Clark MG, Henriksen EJ. Experimental approaches in muscle metabolism: hindlimb perfusion and isolated muscle incubations. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism.* 1994; 266(1): E1-E16.

[64] Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, et al. The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Clin Invest.* 1997; 27(6): 475-483.

[65] Gordon, S. The macrophage. *Bioessays.* 1995; 17: 977-986.

[66] Miyamoto, T., Ohneda, O., Arai, F., Iwamoto, K., Okada, S., Takagi, K., Anderson, D. M., Suda, T. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood.* 2001; 98: 2544-54.

[67] Servet-Delprat, C., Arnaud, S., Jurdic, P., Nataf, S., Grasset, M. F., Soulas, C., Domenget, C., Destaing, O., Rivollier, A., Perret, M., et al. Flt3 macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol.* 2002; 3: 15.

[68] Naito, M., Hasegawa, G., Takahashi, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 39: 350-364.

- [69] Fernandez Pujol, B., Lucibello, F. C., Gehling, U. M., Lindemann, K., Weidner, N., Zuzarte, M. L., Adamkiewicz, J., Elsasser, H. P., Muller, R., Havemann, K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*. 2000; 65: 287-300.
- [70] Schmeisser, A., Garlich, C. D., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R. H., Daniel, W. G. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc. Res*. 2001; 49: 671-680.
- [71] Heinemann, D.E.H., Siggelkow, H., Ponce, L. M., Viereck, V., Wiese, K. G., Peters, J. H. Alkaline phosphatase expression during monocyte differentiation: overlapping markers as a link between monocytic cells, dendritic cells, osteoclasts and osteoblasts. *Immunobiology*. 2000; 202: 68-81.
- [72] Tkachenko N, Wojas K, Tabarkiewicz J, Rolinski J. Generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes--comparison of different culture media. *Folia Histochem Cytobiol*. 2005; 43(1): 25-30.
- [73] Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H et al. Human circulating CD14 monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 2003; 74: 833– 845.
- [74] Masataka Kuwana, Yuka Okazaki, Hiroaki Kodama, Takashi Satoh, Yutaka Kawakami, Yasuo Ikeda. Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-Derived Multipotential Cells. *Stem cells*. 2006; 24(12): 2733-43.
- [75] Zhao Y, Glensne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 2426-31.
- [76] Kodama H, Inoue T, Watanabe R et al. Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14 monocytes. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 209-217.
- [77] Noriyuki Seta, Masataka Kuwana. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med* 2007; 56(2): 41-47.
- [78] Mangi MH, Newland AC. Interleukin-3 in haematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999; 5: 87-95.
- [79] Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A. et al. Differentiation of In Vitro-Modified Human Peripheral Blood Monocytes Into Hepatocyte-like and Pancreatic Islet-like Cells. *Gastroenterology*. 2005; 128 (7): 1774.

[80] Thomas Pufe, Wolf Petersen, Fred Fa"ndrich, Deike Varoga, Christoph J. Wruck, Rolf Mentlein, Andreas Helfenstein, Daniela Hoseas, Stefanie Dressel, Bernhard Tillmann, Maren Ruhnke. Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMO): A Source of Peripheral Blood Stem Cells That Generate Collagen Type II-Producing Chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008; 26(3): 304-313.

[81] B. Dresske, N. E. El Mokhtari, H. Ungefroren, M. Ruhnke, V. Plate, D. Janssen, R. Siebert, A. Reinecke, R. Simon and F. Fandrich. Multipotent Cells of Monocytic Origin Improve Damaged Heart Function. *American Journal of Transplantation*. 2006; 6: 947-958.

[82] Leukocytes: Lymphocytes and Plasma Cells. In *Clinical Hematology, Theory and Procedures*, 5th edition. Mary L. Turgeon. 2012 Lippincott Williams & Wilkins, China.

[83] Lymphocytes. In *Color Atlas of Hematology. Practical Microscopic and Clinical Diagnosis*. Harald Thöml, Heinz Diem, Torsten Haferlach. 2004, 2nd revised edition. Thieme. Stuttgart New York.

[84] Fehmman HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev*. 1995 Jun; 16(3): 390-410.

[85] Drucker DJ. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology*. 2002; 122(2): 531-544.

[86] Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaün-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2005; 31(3): 233-242.

[87] Unger RH, Eisentraut AM. Entero-insular axis. *Arch Intern Med*. 1969; 123(3): 261-266.

[88] Vardarli I, Nauck MA, Köthe LD, Deacon CF, Holst JJ, Schweizer A, et al. Inhibition of DPP-4 with vildagliptin improved insulin secretion in response to oral as well as "isoglycemic" intravenous glucose without numerically changing the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(4): 945-954.

[89] Meier JJ, Nauck MA. Is secretion of glucagon-like peptide-1 reduced in type 2 diabetes mellitus? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Nov; 4(11): 606-607.

- [90] Orskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ. Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J Clin Invest.* 1991; 87(2): 415-423.
- [91] Meier JJ. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23(4): 433-441.
- [92] Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 1993; 36(8): 741-744.
- [93] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52(1): 102-110.
- [94] Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91(1): 301-307.
- [95] Meier JJ, Gallwitz B, Siepmann N, Holst JJ, Deacon CF, Schmidt WE, et al. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia.* 2003; 46(6): 798-801.
- [96] Meier JJ, Nauck MA. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes.* 2010; 59(5): 1117-25.
- [97] Vollmer K, Gardiwal H, Menge BA, Goetze O, Deacon CF, Schmidt WE, et al. Hyperglycemia acutely lowers the postprandial excursions of glucagon-like Peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(4): 1379-85.
- [98] Meier JJ, Gallwitz B, Kask B, Deacon CF, Holst JJ, Schmidt WE, et al. Stimulation of insulin secretion by intravenous bolus injection and continuous infusion of gastric inhibitory polypeptide in patients with type 2 diabetes and healthy control subjects. *Diabetes.* 2004; 53 Suppl 3: 220-224.
- [99] Højberg PV, Vilsbøll T, Rabøl R, Knop FK, Bache M, Krarup T, et al. Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic

polypeptide in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52(2): 199-207.

[100] Herzberg-Schäfer S, Heni M, Stefan N, Häring H-U, Fritsche A. Impairment of GLP1-induced insulin secretion: role of genetic background, insulin resistance and hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14: 85-90.

[101] Schäfer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, et al. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*. 2007; 50(12): 2443-50.

[102] Schäfer SA, Müssig K, Staiger H, Machicao F, Stefan N, Gallwitz B, et al. A common genetic variant in WFS1 determines impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion. *Diabetologia*. 2009; 52(6): 1075-82.

[103] Hansen KB, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(7): 3309-17.

[104] Holst JJ. Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002; 18(6): 430-441.

[105] Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. 2003; 144(12): 5145-48.

[106] Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*. 2003; 144(12): 5149-58.

[107] Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*. 2004; 145(6): 2653-59.

[108] Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2003; 17(2): 161-171.

[109] Göke R, Fehmman HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*. 1993; 268(26): 19650-55.

- [110] Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, et al. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia*. 1999 Jan; 42(1): 45–50.
- [111] Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept*. 2004; 117(2): 77-88.
- [112] Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48(12): 2270-76.
- [113] Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, et al. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet*. 2009; 374(9683): 39-47.
- [114] Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, et al. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2011; 54(5): 1098-1108.
- [115] Jing Yin J, bo Li Y, ming Cao M, Wang Y. Liraglutide Improves the Survival of INS-1 Cells by Promoting Macroautophagy. *Int J Endocrinol Metab*. 2013; 11(3): 184-190.
- [116] Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*. 1999; 42: 856-864.
- [117] Ebinger M, Jehle D, Fussgaenger R, Fehmann H, Jehle P. Glucagon-like peptide-1 improves insulin and proinsulin binding on RINm5F cells and human monocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279: 88-94.
- [118] He L, Kwon Wong C, Cheung K, Yau HC, Fu A, Zhao HL, et al. Anti-inflammatory effects of exendin-4, a glucagon-like peptide-1 analog, on human peripheral lymphocytes in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest*. 2013; 4: 382-392.
- [119] Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia*. 2011; 54: 2745-2754.

- [120] Ahern T, Tobin AM, Corrigan M, et al. Glucagon –like peptide-1 analogue therapy for psoriasis patients with obesity and type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2013; 27: 1440-1443.
- [121] Dai Y, Dai D, Wang X, et al. GLP-1 agonists inhibit ox-LDL uptake in macrophages by activating protein kinase A. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014; 64: 47-52.
- [122] Brenner C, Franz WM, Kuhlenthal Y, et al. DPP-4 inhibition ameliorates atherosclerosis by priming monocytes into M2 macrophages. *Int J Cardiol*. 2015; 163-169.
- [123] Hirano T, Mori Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulintropic polypeptide, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *J Diabetes Investig*. 2016; 7: 80-86.
- [124] Noyan-Ashraf MH, Shikatani EA, Schuiki I, et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. *Circulation* 2013; 127: 74-85.
- [125] Tashiro Y, Sato K, Watanabe T, et al. A glucagon-like peptide-1 analog liraglutide suppresses macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Peptides*. 2014; 54: 19-26.
- [126] Steven S, Jurk K, Kopp M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice. *Br J Pharmacol* 2016; doi: 10.1111/bph.13549.
- [127] Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298: 141-145.
- [128] Semizarov D, Glesne D, Laouar A, Schiebel K, Huberman E. A lineage-specific protein kinase crucial for myeloid maturation. *PNAS* 1998; 95(26): 15412-17.
- [129] Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998; 92(12): 4491-4508.
- [130] Motoyoshi K. Biological activities and clinical application of M-CSF. *Int J Hematol*. 1998; 67(2): 109-122.

- [131] Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, S.C. C, Ogawa M. Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood*. 1992; 79: 2855-60.
- [132] Tsukada J, Misago M, Kikuchi M, et al. Interactions between recombinant human erythropoietin and serum factor(s) on murine megakaryocyte colony formation. *Blood*. 1992; 80: 37-45.
- [133] Siena S, Nicola MD, Bregni M, et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol*. 1995; 23: 1463-71.
- [134] Mitani H, Katayama N, Araki H, et al. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol*. 2000; 109: 288-295.
- [135] Sonoda Y, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: interleukin 3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 4360-64.
- [136] Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood*. 1993; 82: 1960-74.
- [137] Suzuki H, Katayama N, Ikuta Y, Mukai K, Fujieda A, Mitani H, et al. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am J Hematol*. 2004; 75(4): 179-189.
- [138] Son Young-Jin, Chang-Kyu Kim, Byoung-Taek Choi, Yong-Cheol Park, Jin-Ho Seo. Effects of β -Mercaptoethanol and Hydrogen Peroxide on Enzymatic Conversion of Human Proinsulin to Insulin. *Microbiol. Biotechnol*. 2008; 18(5): 983-989.
- [139] Henderson JR, Moss MC. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Journal of Experimental Physiology*. 1985; 70: 347-356.
- [140] Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, et al. Role of VEGF-A in Vascularization of Pancreatic Islets. *Current biology*. 2003; 13(12): 1070-74.
- [141] LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber H-P, et al. Angiogenesis-Independent Endothelial Protection of Liver: Role of VEGFR-1. *Science*. 2003; 299(5608): 890-893.

[142] Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, et al. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell*. 2006; 10(3): 397-405.

[143] Santana A, Enseñat-Waser R, Isabel Arribas M, Reig J A, Roche E. Insulin - producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. *Cell Mol Med*. 2006; 10(4): 866-883.

[144] Holst JJ. Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002; 18: 430-441.

[145] Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaón-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes *Diabetes Metab*. 2005; 31: 233-242.

[146] Boyum A. Isolation of Human Blood Monocytes with Nycodenz, a New Non-Ionic Iodinated Gradient Medium. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1983; 17(5): 429-436.

[147] Almeida M, Silva A, Barral A, Barral Netto M. A Simple Method for Human Peripheral Blood Monocyte Isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(2): 221-223.

[148] Danciger S, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods*. 2004; 288(1-2): 123-134.

[149] Urska Repnika, Miomir Knezevica, Matjaz Jerasa. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *Journal of Immunological Methods*. 2003; 278: 283- 292.

[150] <http://technical.sanguinebio.com/wp-content/uploads/2013/07/flow-cytometry1.jpg>

[151] Dharmalingam M, Sriram U and Baruah M. Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011; 15: 9-17.

[152]. Walter J, Harder O, Faendrich F, Schulze M. Generation of monocyte-derived insulin-producing cells from non-human primates according to an optimized protocol for the generation of PCMO-derived insulin-producing cells. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014; 6: 93-99.

- [153] Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem* 1998 ;124: 428-433.
- [154] Hur J, Yang JM, Choi JI, et al. New method to differentiate human peripheral blood monocytes into insulin producing cells: Human hematosphere culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 418: 765-769.
- [155] Kyventidis A, Tzimagiorgis G, Didangelos T. Peripheral blood monocytes can differentiate into efficient insulin-producing cells in vitro. *Hippokratia*. 2015, 19, 4: 344-351.
- [156] Ferreira IA, Mocking AI, Urbanus RT, Varlack S, Wnuk M, Akkerman WN. Glucose uptake via glucose transporter 3 by human platelets is regulated by protein kinase B. *J Biol Chem*. 2005; 280: 32625-33.
- [157] Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigan V, Ferro. A Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *Plos One*. 2011; 6: e25595.
- [158] Schrier, S. B. et al. Synergistic Communication between CD4+ T Cells and Monocytes Impacts the Cytokine Environment. *Sci. Rep.* 6, 34942; doi: 10.1038/srep34942 (2016).
- [159] Juhl C, Grøfte T, Butler PC, Veldhuis JD, Schmitz O, Pørksen N. Effects of fasting on physiologically pulsatile insulin release in healthy humans. *Diabetes*. 2002; 51: 255-257.
- [160] Raikwar SP, Zavazava N. PDX1-engineered embryonic stem cell-derived insulin-producing cells regulate hyperglycemia in diabetic mice. *Transplant Res*. 2012; 1: 19.
- [161] Franz RW, Shah KJ, Pin RH, Hankins T, Hartman JF, Wright ML. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy is an effective limb salvage strategy for patients with severe peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2015; 62: 673-680.
- [162] Oh KW, Moon C, Kim HY, Oh SI, Park J, Lee JH, et al. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4: 590-597.
- [163] Patel AN, Mittal S, Turan G, Winters AA, Henry TD, Ince H, et al. REVIVE Trial: Retrograde delivery of autologous bone marrow in patients with heart failure. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4: 1021-27.

[164] Zekri AR, Salama H, Medhat E, Musa S, Abdel-Haleem H, Ahmed OS, et al. The impact of repeated autologous infusion of haematopoietic stem cells in patients with liver insufficiency. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 118.

