



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

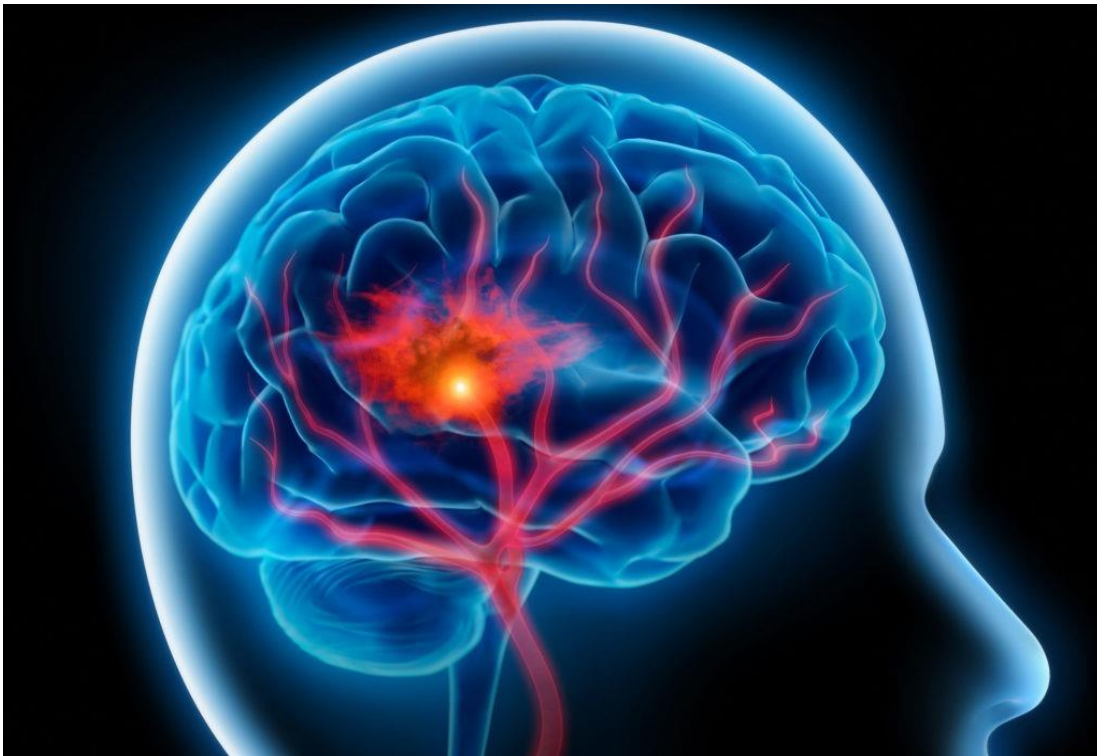
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Βλαστικά κύτταρα - Γονιδιακή-
Κυτταρική θεραπεία (Αναγεννητική Ιατρική)**

**Τίτλος: Ο ρόλος της θεραπείας κυτταρικής υποκατάστασης με βλαστικά
κύτταρα στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο**

Όνομα: Νικολέττα Αναγνώστου

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Τσάμης Κωνσταντίνος





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

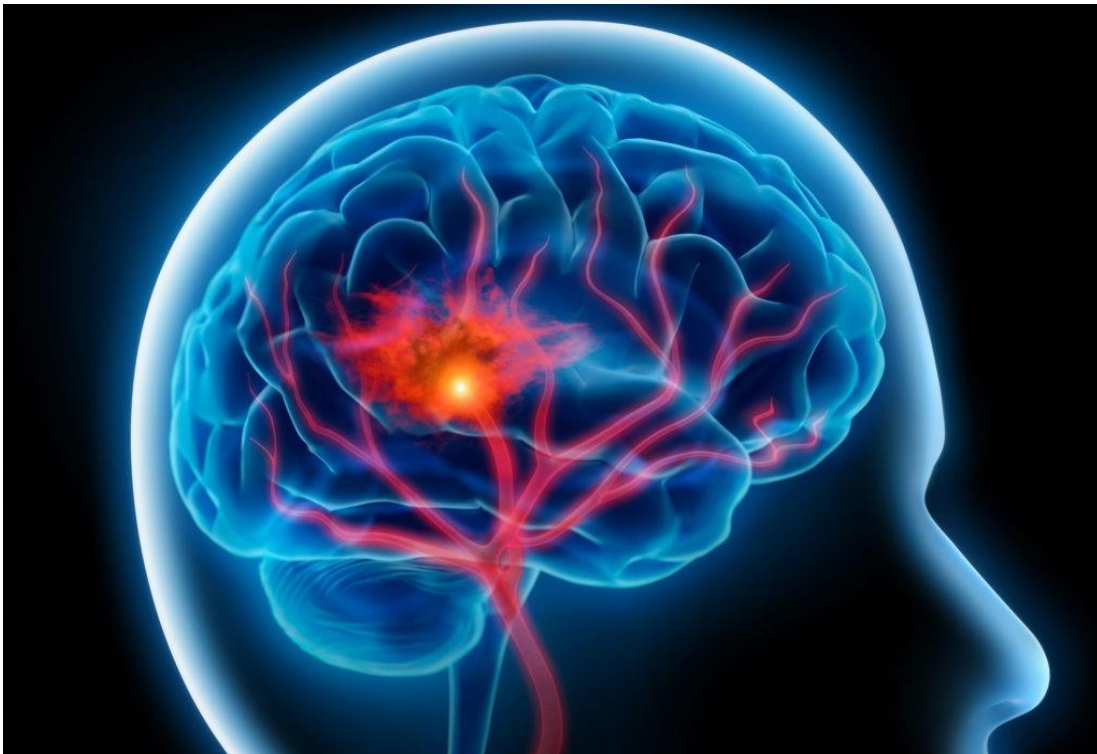
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Βλαστικά κύτταρα - Γονιδιακή-
Κυτταρική θεραπεία (Αναγεννητική Ιατρική)**

**Τίτλος: Ο ρόλος της θεραπείας κυτταρικής υποκατάστασης με βλαστικά
κύτταρα στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο**

Όνομα: Νικολέττα Αναγνώστου

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Τσάμης Κωνσταντίνος



Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Αναγνώστου Νικολέττα

**Ο ρόλος της θεραπείας κυτταρικής
υποκατάστασης με βλαστικά κύτταρα στο
αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσάμης Κωνσταντίνος,
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη: Βεζυράκη Πατρόνα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής
Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

2022

*Στους γονείς μου, τον αδερφό μου
και φυσικά σε όλους τους λάτρεις της νευρολογίας*

Πρόλογος

Στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η παρουσίαση και η εκμάθηση της θεραπείας κυτταρικής υποκατάστασης με βλαστικά κύτταρα στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Η αυξημένη συχνότητα του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και η αυξημένη του νοσηρότητα φαίνεται να επιβάλουν την ανάπτυξη νέων θεραπειών που θα βοηθήσουν τόσο στη θεραπεία όσο και στην αποκατάσταση έπειτα από το συμβάν. Αρχίζει πλέον να καταφαίνεται πως η ανάπτυξη θεραπειών που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα μπορεί να επιτρέψει την εξατομικευμένη προσέγγιση, μειώνοντας τις επιπλοκές. Παράλληλα με την ανάπτυξη θεραπειών, με τη ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας και των θετικών επιστημών, αναπτύχθηκαν μέθοδοι παρακολούθησης των κυττάρων.

Επιδίωξη της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μεταδοθεί στους αναγνώστες με απλό τρόπο και συνάφεια η χρήση των βλαστικών κυττάρων στην αντιμετώπιση του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Παρουσιάζονται τόσο απαραίτητα στοιχεία για το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, όπως οι μηχανισμοί που το διέπουν, όσο και ανάλυση των ειδών των βλαστικών κυττάρων που έχουν χρησιμοποιηθεί ερευνητικά. Κάθε υποενότητα περιλαμβάνει ειδικότερες αναφορές σε θέματα με ιδιαίτερο θεωρητικό, κλινικό ή εργαστηριακό ενδιαφέρον.

Ο κυριότερος στόχος είναι η διέγερση του ενθουσιασμού του αναγνώστη για τα σύγχρονα δεδομένα της έρευνας στο πεδίο των βλαστικών κυττάρων και η χρήση τους στο ισχαιμικό εγκεφαλικό. Οι δυνατότητες που διαφαίνονται στον τομέα αυτόν είναι πλέον περισσότερες από ποτέ και συνεχίζουν να αυξάνονται.

Ευχαριστίες:

Η παρούσα εργασία έχει βελτιωθεί σημαντικά με τα σχόλια και τις υποδείξεις της τριμελούς επιτροπής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά κάθε μέλος για την συμβολή του. Συγκεκριμένα τον επίκουρο καθηγητή φυσιολογίας κ. Τσάμη Κωνσταντίνο ο οποίος εμπνεύστηκε το θέμα και μετέδωσε την αγάπη του για την νευρολογία στους φοιτητές του.

Την καθηγήτρια φυσιολογίας κ. Πατρόνα Βεζυράκη, η οποία πέρα από την άριστη γνώση της φυσιολογίας, με το χιούμορ της, την άμεση διαχείριση όλων των διαδικαστικών θεμάτων και τα σχόλιά της, καλλιτεχνικά και επιστημονικά, προς βελτίωση της εργασίας οδήγησε σε ένα άρτιο αποτέλεσμα. Τέλος, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον επίκουρο καθηγητή γενικής βιολογίας κ. Κούκλη Παναγιώτη, που παρά τις αντίξοες συνθήκες διαδικτυακής διδασκαλίας, κατάφερε να μας μεταλαμπαδεύσει με σαφέστατο τρόπο τις γνώσεις του για τα βλαστικά κύτταρα, ένα θέμα που αποτελεί πρόκληση λόγω της πολυπλοκότητας του.

Νικολέττα Αναγνώστου

Μάιος 2022

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο.....	11
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	11
1.1.2 Ορισμός.....	12
1.1.3 Επιδημιολογία.....	13
1.1.4 Παράγοντες κινδύνου.....	14
1.1.5 Παθοφυσιολογία.....	15
1.1.5A Ο ρόλος των κυτταροκινών.....	16
1.1.5 B Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.....	19
1.1.6 Συμμετοχή φλεγμονωδών κυττάρων.....	20
1.2 Βλαστικά κύτταρα	28
1.2.1 Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα.....	32
1.2.2 Προκλήσεις των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων.....	33
1.2.2A Ογκογένεση.....	34
1.2.2B Ανοσογονικότητα	40
1.2.2Γ Ετερογένεια	43
2. Κυτταρική θεραπεία.....	46
2.1 Ορισμός κυτταρικής θεραπείας.....	46
2.2 Παρούσα κατάσταση κυτταρικών θεραπειών.....	46
3. Παλαιότερα και νέα δεδομένα για τα Βλαστικά κύτταρα...48	
3.1 Σημείο καμπής στην έρευνα για να βλαστικά κύτταρα.....	48
3.2 Τράπεζες βλαστοκυττάρων.....	50
3.3 Τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες σε θεραπείες με βλαστικά κύτταρα.....	51
3.4 Προκλήσεις και ηθικά εμπόδια θεραπειών που βασίζονται σε βλαστικά κύτταρα.....	52
4. Ειδικό μέρος.....	53
4.1 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).....	55
4.1.1 Ενδογενή	57

4.1.2 Εξωγενή.....	58
4.2 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs).....	63
4.3 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs).....	64
4.4 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs).....	65
4.5 Βλαστικά κύτταρα μυελου των οστών (BMSCs).....	69
4.6 Αίμα ανθρώπινου ομφαλίου λώρου (hUCB).....	72
4.7 Βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολφού (DPSCs).....	73
4.8 Ανησυχίες	77
4.8.1 Κυτταρική εγκατάσταση.....	77
4.8.2 Κυτταρική επιβίωση.....	78
4.8.3 Ασφάλεια.....	79
4.8.4 Γονιδιακή θεραπεία.....	79
4.9 Παρακολούθηση κυττάρων.....	81
8. Υλικά και μέθοδοι.....	87
Συμπεράσματα και νέες προοπτικές.....	87-89
Περίληψη.....	90
Abstract.....	90

1. Εισαγωγή:

1.1 Αγγειακό Εγκεφαλικό επεισόδιο:

1.1.1 Ιστορική αναδρομή:

Πάνω από 2.000 χρόνια πριν, Ιπποκράτης (460 έως 370 π.Χ.) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε αυτήν την κατάσταση στα Ιπποκράτεια συγγράμματα και της έδωσαν το όνομα αποπληξία - μια λέξη που υποδηλώνει ένα ξαφνικό, βίαιο χτύπημα.(Thompson 1996). Οι θεραπευτικές επιλογές ήταν περιορισμένες, με το Γαληνό να προτείνει φυσική άσκηση και σωστή διατροφή, τα οποία πλέον θεωρούνται ενδεδειγμένα μέτρα πρόληψης. Ο όρος εγκεφαλικό επεισόδιο χρησιμοποιήθηκε ήδη από το 1599. Μέχρι τον δέκατο έβδομο αιώνα, εθεωρείτο ότι τα εγκεφαλικά οφείλονταν σε μια ανισορροπία στο μείγμα αίματος, κίτρινης χολής, μαύρης χολής και φλέγματος – δηλαδή των τεσσάρων χυμών που περιγράφονται στη χυμική θεωρία που αναπτύχθηκε στην αρχαιότητα για να εξηγήσει τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο σώμα.

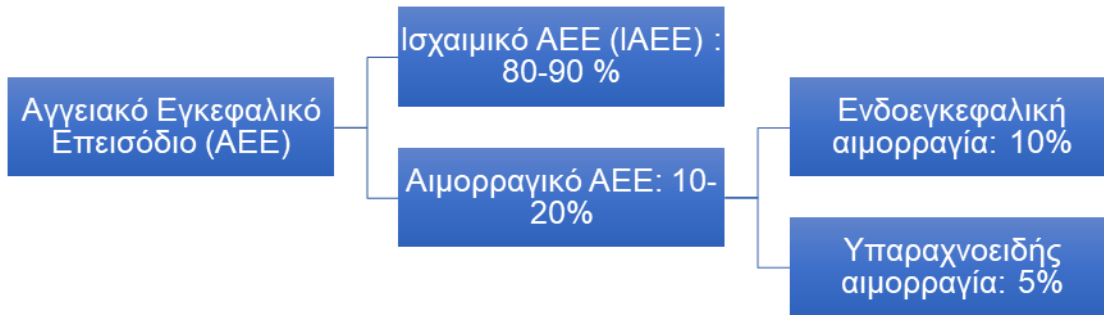
Το 1658, ο Johann Jacob Wepfer, (1620–1695) εντόπισε τις βασικές αιτίες του εγκεφαλικού, παρατηρώντας μεταθανάτια δύο μορφές εγκεφαλικού επεισοδίου, το ισχαιμικό και το αιμορραγικό. Επίσης, αναγνώρισε και τις σπονδυλικές και έσω καρωτίδες, αγγεία θεμελιώδη για την άρδευση του εγκεφάλου. Αργότερα ο Rudolf Virchow περιέγραψε τον μηχανισμό της θρομβοεμβολής ως κύριο παράγοντα πρόκλησης του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Από το 1990 και έπειτα ο American Stroke Association, εισήγαγε τον όρο εγκεφαλική προσβολή ώστε να υποδηλώσει την οξεία φύση του εγκεφαλικού επεισοδίου (Thompson 1996).



Εικόνα 1: Johann Jacob Wepfer (Αριστερά) , και Ιπποκράτης (Δεξιά). Πηγή: Wikipedia

1.1.2 Ορισμός:

Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) ορίζεται βάσει του παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (1970) ως «Το ταχέως εξελισσόμενο κλινικό σύνδρομο εστιακών (ή γενικευμένων) διαταραχών της εγκεφαλικής λειτουργίας αγγειακής αιτιολογίας, που διαρκεί πάνω από 24 ώρες ή οδηγεί σε θάνατο». (Coupland et al. 2017) Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες του ΑΕΕ, το ισχαιμικό και το αιμορραγικό, το οποίο μάλιστα διακρίνεται περαιτέρω σε ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και υπαραχνοειδή αιμορραγία (Σχήμα 1). (Coupland et al. 2017)



Σχήμα1: Ταξινόμηση του Αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου

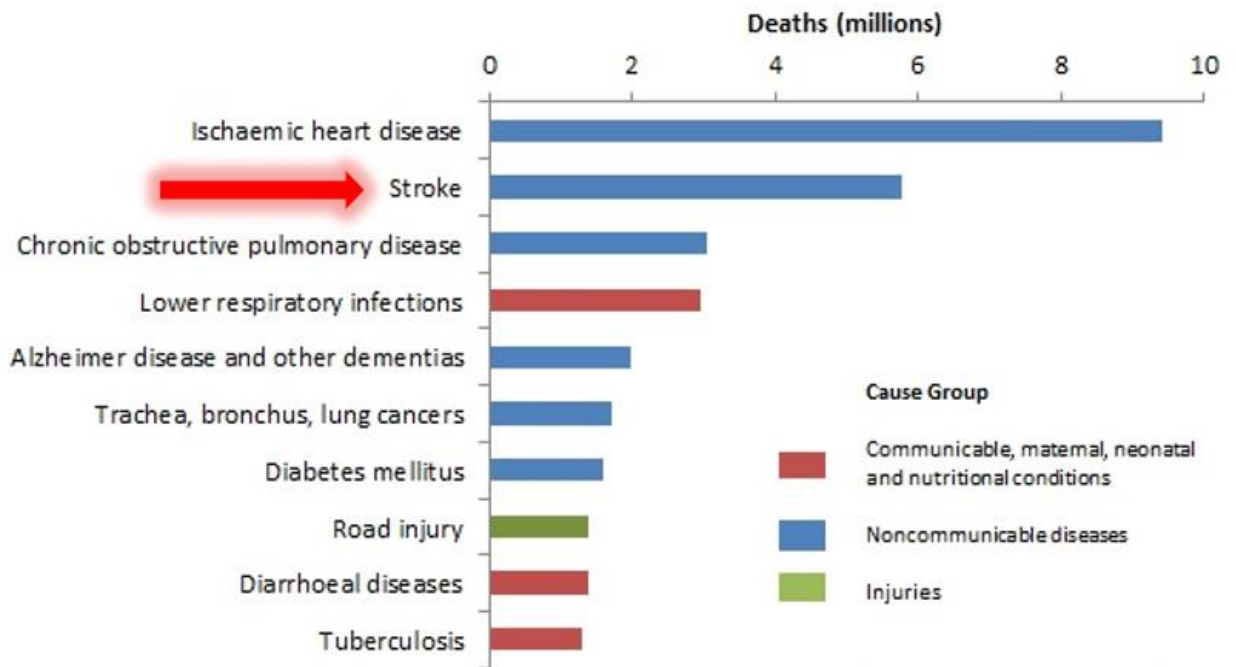
Η παρούσα εργασία αφορά το ισχαιμικό ΑΕΕ. Οι μείζονες κατηγορίες των ΙΑΕΕ είναι:

- Η θρόμβωση
- Η εμβολή
- Η σφαιρική ισχαιμική βλάβη – Υποτασικό ΑΕΕ

1.1.3 Επιδημιολογία:

Από τα 56,9 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως το 2016, περισσότεροι από τους μισούς (54%) οφείλονταν στις 10 πρώτες αιτίες. Οι ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις και τα εγκεφαλικά επεισόδια αντιπροσωπεύουν συνολικά 15,2 εκατομμύρια θανάτους το 2016 (παραμένουν οι κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως τα τελευταία 15 χρόνια). (Σχήμα 2)

Top 10 global causes of deaths, 2016



Σχήμα 2: Αιτίες θανάτου κατά τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας, 2016

1.1.4 Παράγοντες κινδύνου:

Για την πρόκληση ενός αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου συμμετέχουν τόσο γενετικοί παράγοντες (μπορεί να οδηγήσουν αυξημένη ΑΠ, εγκεφαλικό και άλλες παθήσεις σχετιζόμενες πχ δρεπανοκυτταρική αναιμία) όπως και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Έτσι μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως κάποιοι παράγοντες είναι τροποποιήσιμοι ενώ άλλοι όχι. (Πίνακας 1)

Τροποποιήσιμοι	Μη τροποποιήσιμοι
Παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο	Ηλικία
Υπέρταση	Φύλο
Λιπίδια	Κληρονομικότητα
ΣΔ	Εθνικότητα
Παράγοντες πηκτικού μηχανισμού	Προηγούμενο ΑΕΕ
Καρδιακές παθήσεις	
Φλεγμονή	
Κάπνισμα	
αλκοόλ	

Πίνακας 1: Παράγοντες κινδύνου Αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (Maida et al. 2020)

1.1.5 Παθοφυσιολογία:

Ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται εντός 6 λεπτών λόγω της έλλειψης γλυκόζης και την παροχής ης οξυγόνου , στην κεντρική περιοχή του εμφράκτου, περιοχή γνωστή και ως umbra. Η umbra περιβάλλεται από την penumbra, η οποία αφορά σε ιστό που έχει την ικανότητα αναγεννηθεί. (Sacco et al. 2013)

Η φλεγμονώδης αντίδραση που εμφανίζεται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα λαμβάνει χώρα σε πολλαπλές οξείες παθολογίες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου και του ΙΑΕΕ. Η προσβολή του εγκεφάλου που ακολουθεί το ισχαιμικό εγκεφαλικό έχει ως αποτέλεσμα νέκρωση και απόπτωση. Όλα αυτά οδηγούν σε φλεγμονώδη αντίδραση που ελέγχεται από την απελευθέρωση ROS, χημειοκινών και κυτοκινών. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα στη μικροκυκλοφορία και περιλαμβάνει διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως τα έμφυτα ανοσοκύτταρα (μικρογλοία) και τα προσαρμοστικά ανοσοκύτταρα

(λεμφοκύτταρα) που προκαλούν νευρωνικό θάνατο. Αφού εμφανιστεί φλεγμονή στον εγκέφαλο, εντείνεται η απελευθέρωση πολλαπλών κυτταροκινών τόσο στον κατεστραμμένο εγκεφαλικό ιστό όσο και στο περιφερικό αίμα. Αυτές οι κυτταροκίνες αντιπροσωπεύουν σημαντικούς μεσολαβητές κατά τη διάρκεια της επαγόμενης από εγκεφαλικό ανοσοφλεγμονώδους αντίδρασης, που εμπλέκονται στην εξέλιξη του εγκεφαλικού εμφράκτου, επηρεάζοντας τελικά τη σοβαρότητα και την έκβαση της νόσου (Maida et al. 2020).

1.1.5A Ο ρόλος των Κυτταροκινών:

Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος, ρυθμίζοντας τη διαδικασία της κυτταρικής ενεργοποίησης, διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού. Σχεδόν κάθε εμπύρνηνο κύτταρο μπορεί να παράγει κυτοκίνες για να ρυθμίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ ανοσοκυττάρων (μακροφάγα, τα Β και Τ λεμφοκύτταρα) , με τελικό σκοπό την ανοσολογική απάντηση. Οι κυτοκίνες με προφλεγμονώδη δράση εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον εγκεφαλικό ιστό όπου μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες και γλοία. Λόγω αυτής της περίπλοκης και πολυβάθμιας διαδρομής, θα μπορούσαν να αυξήσουν την κυτταρική κίνηση ή να προκαλέσουν επιπλέον τραυματισμό. Οι πιο σημαντικές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αναγράφονται στον πίνακα 2.

Κυτταροκίνες	
TNF-α (Murakami et al. 2005)	<ul style="list-style-type: none"> ● Συμμετέχει σε όλες σχεδόν τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες ● Μία από τις πρώτες κυτοκίνες που αναδύονται στο πλαίσιο της φλεγμονώδους αντίδρασης μετά από ισχαιμικό τραυματισμό στον εγκέφαλο ● Διέγερση της φλεγμονώδους διαδικασίας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στον ορό αίματος ● Η TNF-α αυξάνεται εντός 24-48 ωρών μετά το ΙΑΕΕ.

	<ul style="list-style-type: none"> ● Ήπια μείωση, η οποία λαμβάνει χώρα εντός 72 ωρών μετά από ένα εγκεφαλικό, συσχετίζεται με βελτίωση της κλινικής εικόνας. ● Προστασία του εγκεφαλικού παρεγχύματος : προφλεγμονώδης λειτουργία κατά το πρώτο στάδιο της φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και ανοσοκατασταλτική κατά τη χρόνια φάση.
<p>IL-1β (Protopsal tis et al. 2009)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Μετά την εγκεφαλική ισχαιμία, η IL-1β μπορεί να ενεργοποιήσει τον πυρηνικό παράγοντα (NF)-κΒ μέσω της διέγερσης των TLRs. Μετά από αυτή τη διαδικασία ενεργοποιείται το τμήμα του γονιδιώματος που σχετίζεται με χημειοκίνες, κυτοκίνες και άλλους προφλεγμονώδεις παράγοντες ● Αλληλεπίδραση με το αγγειακό ενδοθήλιο αυξάνοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων προάγοντας τελικά την εμφάνιση οιδήματος ● Τα επίπεδα IL-1β συσχετίστηκαν με κακή πρόγνωση και μειωμένη μακροπρόθεσμη λειτουργική αποκατάσταση. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα IL-1Ra φάνηκαν να σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο λοιμώξεων μετά το ισχαιμικό εγκεφαλικό
<p>IL-6 (Suzuki, Tanaka, and Suzuki 2009)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Προκαλεί την παραγωγή CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και άλλων πρωτεϊνών οξείας φάσης (APPs) από τα ηπατικά κύτταρα, προάγοντας τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων ● Κρίσιμη για το εγκεφαλικό παρέγχυμα στο πρώτο στάδιο της ισχαιμίας ● Νευροτροφικό ρόλο σε επόμενα στάδια ● Επαληθευμένος δείκτης φλεγμονής κατά το εγκεφαλικό επεισόδιο ● Αυξάνεται σημαντικά στον ορό όχι περισσότερο από λίγες ώρες μετά την έναρξη της παθολογίας. Αυτή η κορυφή

	<p>παρέμεινε έως και 90 ημέρες μετά την εγκεφαλική ισχαιμία</p> <ul style="list-style-type: none"> • Η αυξημένη συγκέντρωση της IL-6 τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) όσο και στον ορό έχει συνδεθεί με επιβαρυντικά νευρολογικά συμπτώματα, και χειρότερη πρόγνωση.
<p>IFN-γ (Benjamin D. Granta, Chelsey A. Smithb, Philip E. Castlec, d, Michael E. Scheurere 2017)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Κεντρικός ρυθμιστής του ανοσοποιητικού • Διεγείρει την έκφραση MHC τάξης I και II μέσω T κυττάρων και μακροφάγων (αντιγονοπαρουσίαση) • Ο ετεροδιμερής υποδοχέας (IFN-γR) στην επιφάνεια του κυττάρου μεσολαβεί στην κυτταρική απόκριση σε καταρράκτες μεταγωγής σήματος → ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. • Υψηλότερη έκφραση της IFN-γ σε αθηροσκληρωτικές βλάβες- αθηρογένεση. • Φαίνεται ότι η IFN-γ μπορεί να ρυθμίσει ενεργά την πύλωση της μικρογλοίας, προάγοντας φαινότυπο υπεύθυνο για παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και οξειδωτικών μεταβολιτών.

Πίνακας 2: Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ρόλος αυτών.

Αυξημένη απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών έχει αναφερθεί σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας και θα μπορούσε να συσχετιστεί με πλέον εκτεταμένη ισχαιμική περιοχή και φτωχότερη έκβαση. Η IL-6 μπορεί να προκαλέσει την έκκριση της προσταγλανδίνης E2 στο εγκεφαλικό παρέγχυμα προκαλώντας τελικά αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος λόγω της επίδρασης στον υποθάλαμο. Αρκετές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματικά εγκεφαλικά επεισόδια έχουν αναφέρει ότι ο πυρετός σχετίζεται με χειρότερη έκβαση. Έτσι, η πρόωμη και παρατεταμένη αύξηση της IL-6 στο ENY και στο αίμα πιθανότατα συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα

αυξημένης θερμοκρασίας που διεγείρει τη φλεγμονή και τον επακόλουθο τραυματισμό του εγκεφαλικού παρεγχύματος μετά από εγκεφαλικό. (Maida et al. 2020)

1.1.5B Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες:

Κύριες κυτοκίνες αυτής της κατηγορίας είναι οι ακόλουθες:

- IL-10, μια πρωτεΐνη με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα μονοκύτταρα είναι οι κύριοι παραγωγοί αυτής της πρωτεΐνης (και από άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως λεμφοκύτταρα Th2, μαστοκύτταρα κλπ) (Benjamin D. Granta, Chelsey A. Smithb, Philip E. Castlec, d, Michael E. Scheurere 2017). Η IL-10 εμπλέκεται στον περιορισμό της εγκεφαλικής βλάβης κατά τη διάρκεια της εγκεφαλικής ισχαιμίας, καταστέλλοντας την υπερβολική έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπλέον, φάνηκε ότι η ισχαιμική εγκεφαλική περιοχή θα μπορούσε να μειωθεί από την επίδραση της IL-10 (O'Garra et al. 2004)
- Transforming growth factor beta (TGF-β) είναι ένας αυξητικός παράγοντας που είναι παρών σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα και μπορεί να αναστείλει τα ουδετερόφιλα, τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα της μικρογλοίας, μειώνοντας έμμεσα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών με επιβλαβείς επιπτώσεις στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μετά από ένα ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές που είναι οι TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3. Η τελευταία παίζει ρόλο στη διαδικασία επιβίωσης των νευρώνων και προάγει την ανάκτηση του εγκεφαλικού παρεγχύματος. (Gross et al. 1993)
- IL-4 είναι μια κυτοκίνη ικανή να ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Παίζει ζωτικό ρόλο κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων T helper type 2 (Th2) και μπορεί να πολώσει τα μακροφάγα/μικρογλοία προς τον τύπο M2, ο οποίος έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και εκκρίνει πολλούς παράγοντες ανάκτησης του εγκεφαλικού ιστού (Rietdijk et al. 2022). Μπορούν επίσης να μειώσουν τη φλεγμονή προάγοντας τη φαγοκυττάρωση των νεκρών κυττάρων και την πρωτεόλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. (Rietdijk et al. 2022)

Σε φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Η ακριβής διαδικασία αυτής της

αλληλεπίδρασης και η συσχέτιση με την κλινική έκβαση είναι ακόμη ασαφής. Η απώλεια αυτής της ισορροπίας προς όφελος της φλεγμονής προκαλεί μια πιο σοβαρή νευρολογική συμπτωματολογία. Ωστόσο, αυτή τη στιγμή, δεν μπορούν να προσδιοριστούν επακριβώς οι διαδικασίες που διαμορφώνουν αυτήν την αλληλεπίδραση.

1.1.6 Συμμετοχή φλεγμονωδών κυττάρων:

Υπάρχει μια στενή σύνδεση μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω πολύπλοκων δικτύων επικοινωνίας. Το ανοσοποιητικό σύστημα παρακολουθεί τη λειτουργία του εγκεφάλου και αντιδρά όταν η εγκεφαλική ομοιόσταση μεταβάλλεται λόγω τραυματισμών ή ασθενειών. Όπως έχει προαναφερθεί, το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (IAEE) προάγει την ισχυρή φλεγμονή που περιλαμβάνει την τοπική παραγωγή κυτοκινών, όπως ο Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), από διάφορους κυτταρικούς τύπους στον εγκεφαλο, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων, των ενεργοποιημένων νευρογλοιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων, με επακόλουθη βλάβη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και διήθηση πολλαπλών τύπων λευκοκυττάρων μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα. Τα ανωτέρω μπορούν να παίξουν μια νευροκαταστροφική ή νευροπροστατευτική λειτουργία και η σοβαρότητα της εγκεφαλικής βλάβης συσχετίζεται αυστηρά με την ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο πιθανών λειτουργιών.

Εκτός από νευρώνες στην ανάπτυξη εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από το IAEE συμμετέχουν και άλλοι κυτταρικοί τύποι. Αρχικά αναπτύσσεται φλεγμονή λόγω της ισχαιμίας, η οποία ξεκινά με την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων και περιλαμβάνει διάφορους τύπους κυττάρων. Παρατηρείται η ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων που «κατοικούν» στον εγκεφαλο. Τα λευκοκύτταρα, ακολουθούμενα από μονοκύτταρα και άλλα κύτταρα με ανοσολογικές λειτουργίες, εισέρχονται στον εγκεφαλικό ιστό. Αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να προκαλέσει εγκεφαλική βλάβη από ισχαιμία, που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό οιδήματος και τον προοδευτικό θάνατο νευρώνων. Διάφοροι κυτταρικοί τύποι εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία και μπορεί να έχουν επιζήμια ή ευεργετική επίδραση ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της ισχαιμίας, πρώιμης ή καθυστερημένης. (Maida et al. 2020)

Μικρογλοία:

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι κύτταρα που κατοικούν στον εγκέφαλο, ανήκουν στο έμφυτη ανοσία και αποτελούν το 5-20% όλων των νευρογλοιακών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα διεγείρονται μετά από την εγκεφαλική ισχαιμία αλλάζοντας μορφολογικά και φαινοτυπικά. Επίσης, είναι ένας από τους πρώτους κυτταρικούς τύπους που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, λίγα μόλις λεπτά μετά την έναρξη της ισχαιμίας, με κορύφωση 10 ημέρες μετά την παροδική εστιακή ισχαιμία στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (Schilling et al. 2005). Τα μικρογλοιακά κύτταρα προσλαμβάνουν τον ενεργοποιημένο φαινότυπο τους μετά την ισχαιμική προσβολή, σχηματίζοντας διακλαδώσεις παίρνοντας έτσι μια αμοιβοειδή όψη. Μετά από αυτή τη διαδικασία, τα κύτταρα μικρογλοίας μοιάζουν με μακροφάγα όχι μόνο στην δομή αλλά και στις λειτουργίες τους, όπως η αντιγονοπαρουσίαση, η απελευθέρωση κυτοκινών και η έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών ικανές να βλάψουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αυξάνοντας τελικά τη διαπερατότητά του. Έτσι, διευκολύνεται η πρόωμη διέλευση των λευκοκυττάρων από τη συστηματική κυκλοφορία στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, με αποτέλεσμα αυξημένη συγκέντρωση προφλεγμονωδών παραγόντων ικανών να επιδεινώσουν τον τραυματισμό λόγω της ισχαιμίας. Κατά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας λαμβάνονται δύο διαφορετικοί φαινότυποι: Ο κλασσικός ενεργοποιημένος (M1) και ο εναλλακτικός (M2) (Maida et al. 2020). Ο φαινότυπος M1 έχει προφλεγμονώδη λειτουργία και μπορεί να απελευθερώσει κυτοκίνες και ουσίες με οξειδωτικές ιδιότητες, όπως το μονοξειδίο του αζώτου, τον TNF, την IL-6 και την IL-1 β (Schilling et al. 2005). Ο φαινότυπος M2 παίζει ευεργετική δράση προάγοντας την επούλωση του εγκεφαλικού παρεγχύματος μετά την ισχαιμική προσβολή και απελευθερώνοντας αντιφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-4 και η IL-10. Εκκρίνει επίσης πολλαπλούς παράγοντες με νευροτροφικές ιδιότητες ικανές να αποτρέψουν τη φλεγμονή.

Κατά την εγκεφαλική ισχαιμία, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στα πρώτα στάδια ο πρωταρχικός φαινότυπος τόσο των ενδημικών μικρογλοιακών κυττάρων όσο και των μακροφάγων που προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία είναι ο M2. Οι

νευρώνες που βρίσκονται στις περιοχές που επηρεάζονται από εγκεφαλικό επεισόδιο μπορούν να επάγουν την μετάβαση στον φαινότυπο M2 των μικρογλοιακών κυττάρων και των μακροφάγων (Schilling et al. 2005).

Αστροκύτταρα:

Τα αστροκύτταρα συμμετέχουν βαθιά στη διατήρηση της σωστής λειτουργίας του ΚΝΣ. Ρυθμίζουν την ισορροπία του νερού και των διαφόρων ιόντων, μεταφέρουν πολλαπλά προϊόντα και απόβλητα του κυτταρικού μεταβολισμού, εκκρίνουν ορισμένους νευροτροφικούς παράγοντες και αφαιρούν νευρομεσολαβητές μετά από τυχόν συνάψεις. Τα αστροκύτταρα επηρεάζουν ακόμη και τη δομή του ΑΕΦ. Κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης, τα αστροκύτταρα μπορούν να μετατρέψουν το υπερβολικό γλουταμικό έξω από τα κύτταρα σε γλουταμίνη που θα χρησιμοποιηθεί ξανά από τους νευρώνες. Ωστόσο, μετά από εγκεφαλική βλάβη, αυτή η ικανότητα των αστροκυττάρων εξασθενεί (Maida et al. 2020). Μετά την ισχαιμία, τα νευρογλοιακά κύτταρα και οι νευρώνες απελευθερώνουν κυτοκίνες ικανές να προκαλέσουν αντιδραστική υπερπλασία των αστροκυττάρων προκαλώντας την έκκριση παραγόντων [νεστίνη, βιμεντίνη, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) , IL-1 β και χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1] που επάγουν την αντιδραστική γλοιώση (Maida et al. 2020). Η δυσλειτουργία της αντλίας Na⁺-K⁺ μετά την εγκεφαλική ισχαιμική βλάβη, προκαλεί τη διόγκωση αστροκυττάρων, αυξάνοντας την ενδοεγκεφαλική πίεση μειώνοντας έτσι την αιμάτωση του εγκεφαλικού παρεγχύματος (Sykoná 2001). Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν την πρωτεΐνη μήτρας-2 ικανή να βλάψει την εξωκυτταρική μήτρα και να προάγουν την παρουσία της εφρίνης-A5 στην εγκεφαλική περιοχή που έχει τραυματιστεί από ισχαιμία, παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των νευραξόνων (Maida et al. 2020).

Ουδετερόφιλα:

Η εμφάνιση των ουδετεροφίλων είναι αρκετά πρόωμη, φτάνοντας στο εγκεφαλικό παρέγχυμα 30 λεπτά έως λίγες ώρες μετά τη βλάβη λόγω ισχαιμίας, με κορύφωση τις επόμενες 3 ημέρες και σταδιακή μείωση. Αυτός ο κυτταρικός τύπος μπορεί να εμφανίσει μόρια προσκόλλησης στο ενδοθήλιο μόλις 15 λεπτά μετά την ισχαιμική βλάβη. (Maida et al. 2020) Στις επόμενες 6-8 ώρες, ουδετερόφιλα περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία του εγκεφάλου και εγκαθίσταται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η ακριβής λειτουργία των ουδετεροφίλων στην ανάπτυξη ισχαιμικής βλάβης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Έχουν προταθεί μηχανισμοί όπως: η απόφραξη της ροής του αίματος στην εγκεφαλική κυκλοφορία (CBF) από την έκκριση αγγειοσυσπαστικών παραγόντων ή η ακραία απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων, ROS και ενζύμων με υδρολυτικές ιδιότητες (Connolly et al. 1996). Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να παράγουν Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), βλάπτοντας τον ΑΕΦ και το εγκεφαλικό παρέγχυμα προκαλώντας οίδημα και αιμορραγική μετατροπή. Ο όγκος του εμφράγματος και τα λειτουργικά ελλείμματα είναι ανάλογα με την αύξηση των ουδετεροφίλων (Maida et al. 2020).

T- λεμφοκύτταρα:

Σε αντίθεση με τους προηγούμενους κυτταρικούς τύπους, τα T λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στις μεταγενέστερες φάσεις της εγκεφαλικής ισχαιμίας. Διεισδύουν εντός 3 ημερών στην περιφερική ζώνη που περιβάλλει τη βλάβη μειούμενα προς το κέντρο, συχνά κοντά στην αρτηριακή κυκλοφορία. ο αριθμός τους αυξάνεται μετά από 3 ημέρες με το μέγιστο μετά από μια εβδομάδα, στη συνέχεια μειώνεται μετά από μια άλλη (Maida et al. 2020). Διαφορετικές μελέτες προσπάθησαν να ανακαλύψουν το ρόλο των διαφόρων τύπων T κυττάρων κατά την εγκεφαλική ισχαιμία. Τρεις τύποι T κυττάρων μπορούν να αναγνωριστούν, βάσει του ρόλου, των παραγόμενων κυτταροκινών και του δείκτες επιφανείας:

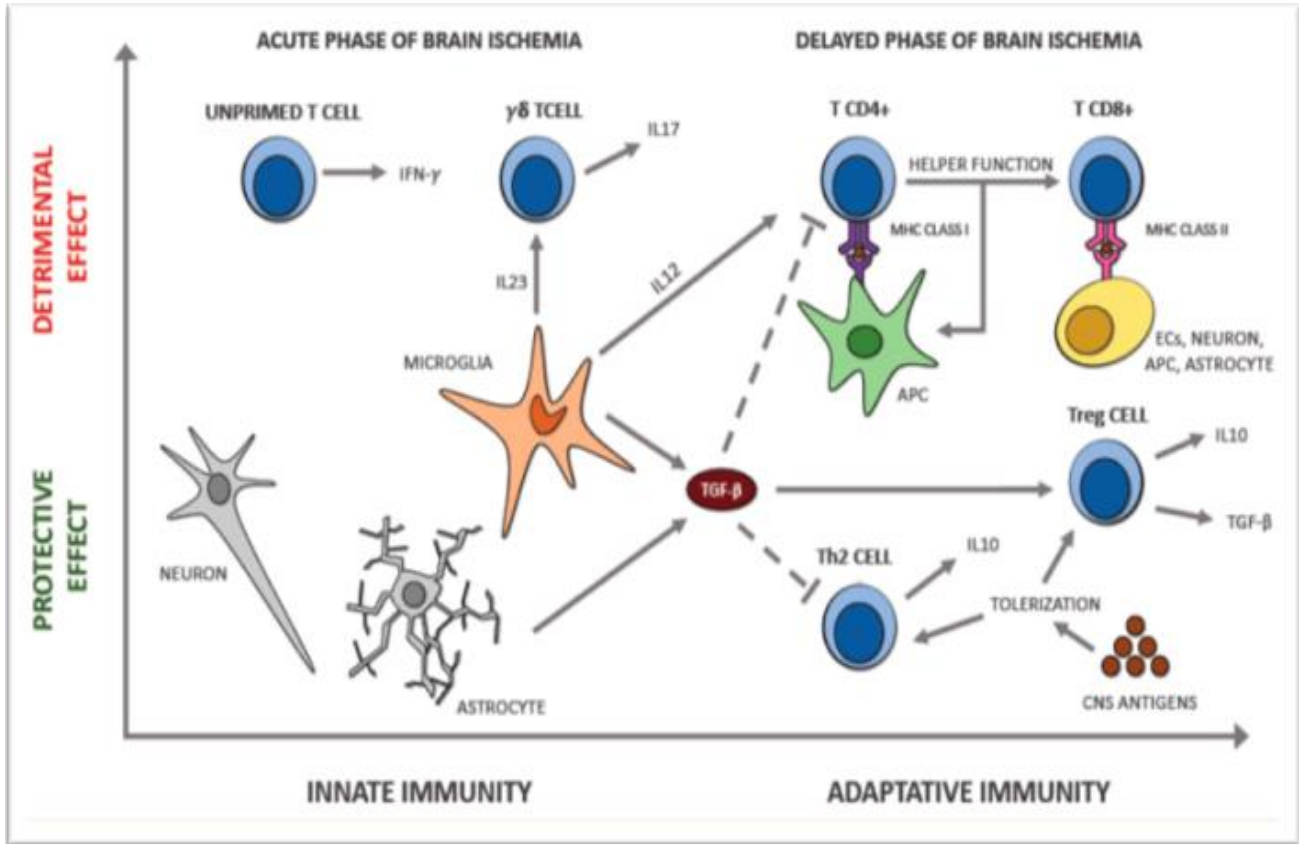
- Τα κυτταροτοξικά (CD8+)
- Τα βοηθητικά (CD4+)
- Τα ρυθμιστικά (Tregs).

Τα CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων οδηγούν στην ανάπτυξη φλεγμονής και θρόμβωσης, με κατά συνέπεια την αύξηση της εγκεφαλικής βλάβης και επιδεινωμένο νευρολογικό έλλειμμα. Τα ανοσοτροποποιητικά κύτταρα Tregs εκθέτουν στην επιφάνειά τους το CD25 και έναν παράγοντα μεταγραφής, το Foxp3. Αυτός ο υπότυπος αντιπροσωπεύει το 10% όλων των κυττάρων CD4⁺. Τα κύτταρα Treg και IL-10 αποτελούν βασικούς νευροπροστατευτικούς παράγοντες από φλεγμονώδη μεταισχαιμική εγκεφαλική βλάβη με το να εξουδετερώνουν την καταστροφική δράση της IFN- γ , του TNF- α και άλλων κυτοκινών με προφλεγμονώδη λειτουργία (Sakaguchi and Sakaguchi 2005). Επιπλέον, τα Treg κύτταρα πιθανά παρεμβαίνουν στην προσέλκυση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η εξάντληση του Treg σε ποντίκια, με τη μεσολάβηση του ειδικού αντισώματος CD25, επιδείνωσε την απώλεια ιστού και συσχετίστηκε με σοβαρότερη νευρολογική συμπτωματολογία 7 ημέρες μετά την ισχαιμία που προκλήθηκε από Middle cerebral artery occlusion (MCAO), ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο εγκεφαλικού σε ποντίκια και αρουραίους. (Liesz et al. 2009)

Ο T cell receptor (TCR) ενός μικρού πληθυσμού περιφερικών T-κυττάρων αντί για α και β πολυπεπτιδικές αλυσίδες (TcR-2, Τα β -κύτταρα) έχει γ και δ αλυσίδες (TcR-1, T $\gamma\delta$ -κύτταρα, 5%). Τα T- $\gamma\delta$ κύτταρα αποτελούν το 5% των περιφερικών λευκοκυττάρων και φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από ισχαιμία. Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι τα ποντίκια που δεν είχαν TCR- $\gamma\delta$ είχαν μια αξιοσημείωτη μείωση του εγκεφαλικού ιστού που εμπλέκεται στην ισχαιμία. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε ποντίκια μετά τη χορήγηση αντισωμάτων έναντι αυτού του υποδοχέα. (Gelderblom, Arunachalam, and Magnus 2014)

Τα CD4⁺ T (T helper) λεμφοκύτταρα που δεν έχουν την επιφανειακή πρωτεΐνη CD28 εμπλέκονται καθοριστικά στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Ενώ αυτά τα λεγόμενα CD4⁺CD28null T κύτταρα σπάνια εκφράζονται σε υγιή άτομα, το κλάσμα τους επεκτείνεται έντονα κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής. Τα CD4⁺ CD28null T κύτταρα αποτελούν το 0,1–2,5% των CD4⁺ T κυττάρων που βρίσκονται στο αίμα. Μπορούν να απελευθερώσουν σημαντική ποσότητα IFN- γ και TNF- α και κατά συνέπεια έχουν προφλεγμονώδη δράση. Επίσης, παράγει το γρανζύμο A, το γρανζύμο B και περφορίνη που συνήθως απελευθερώνονται από τα CD8⁺ T κύτταρα και NK και όχι από

τα T CD4+. Τα CD4+ CD28null T κύτταρα είναι ανθεκτικά στα αποπτωτικά σήματα και στην κατασταλτική δράση από τα Tregs (Maida et al. 2020) Τα ανωτέρω συνοψίζονται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Η επίδραση των T- λεμφοκυττάρων στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Maida et al. 2020)

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των ανοσοκυττάρων μπορεί να εξηγηθεί όχι μόνο από το περιβάλλον των κυτοκινών αλλά περιλαμβάνουν και διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις με μηχανισμούς οι οποίοι δεν είναι ακόμα κατανοητοί.

Στο σχήμα (Σχήμα 4) παρουσιάζεται με αδρή σύνοψη των βασικών πληροφοριών για τα φλεγμονώδη κύτταρα που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του IAEΕ.



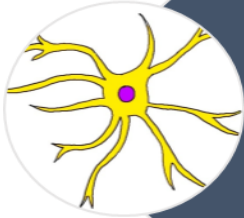
Μικρογλοιακά κύτταρα:

5-20% όλων των νευρογλοιακών κυττάρων
Από τους πρώτους κυτταρικούς τύπους που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση

προσλαμβάνουν μετά την ισχαιμική προσβολή, αμοιβοειδή όψη

Κατά την ενεργοποίηση δύο φαινότυποι:

- 1) Ο κλασσικός ενεργοποιημένος (M1) (προφλεγμονώδης λειτουργία)
- 2) Ο εναλλακτικός (M2) (ευεργετική δράση)



Αστροκύτταρα:

Ρυθμίζουν Ισορροπία του νερού, ιόντων,

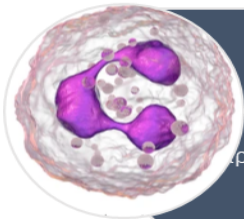
Μεταφέρουν προϊόντα μεταβολισμού

Εκκρίνουν νευροτροφικούς παράγοντες

Επηρεάζουν τη δομή του ΑΕΦ.

Μετατρέπουν το υπερβολικό εξωκυττάριο γλουταμικό έξω σε γλουταμίνη (μετά από εγκεφαλική βλάβη εξασθενεί)

Ισχαιμική βλάβη → δυσλειτουργία της αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ → διόγκωση αστροκυττάρων, → ενδοεγκεφαλική πίεση

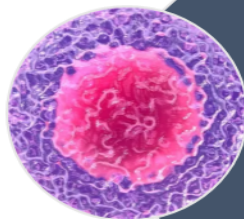


Ουδετερόφιλα:

Η εμφάνιση των ουδετεροφίλων είναι αρκετά πρώιμη, μετά την ισχαιμική βλάβη

Αδιευκρίνιστη λειτουργία

Παράγουν MMP-9 → βλάβη ΑΕΦ και εγκεφαλικού παρεγχύματος → οίδημα και αιμορραγική μετατροπή



T-λεμφοκύτταρα:

Συμμετέχουν στις μεταγενέστερες φάσεις της εγκεφαλικής ισχαιμίας.

Κυτταροτοξικά (CD8+), Βοηθητικά (CD4+), Ρρυθμιστικά (Tregs).

Τα CD4+ και CD8+ T-κύτταρα → φλεγμονή και θρόμβωση

Treg: νευροπροστατευτικός παράγοντας, εξουδετερώνει την δράση των IFN- γ , TNF- α

$\gamma\delta$ T-κύτταρα: συμμετέχουν στην ανάπτυξη εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από ισχαιμία.

Τα CD4+ CD28null T (υπότυπος T helper): αυξημένη απελευθέρωση IFN- γ , TNF- α , ανθεκτικά στα αποπτωτικά σήματα και στην καταστολή από τα Tregs

Σχήμα 4: Σύνοψη βασικών κατηγοριών και ιδιοτήτων ανοσοποιητικών κυττάρων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του εγκεφαλικού

Το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι μια πολύπλοκη παθολογία και πολλοί παράγοντες, όπως η σοβαρότητα και, η θέση του εγκεφαλικού επεισοδίου, η ηλικία και οι συννοσηρότητες του ασθενούς, μπορούν να επηρεάσουν όχι μόνο την αλληλεπίδραση αλλά και την ισορροπία μεταξύ των κυτταρικών τύπων στο νεκρωτικό εγκεφαλικό παρέγχυμα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την τοπική έκκριση κυτοκινών, η οποία έχει κρίσιμη λειτουργία στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων εμπλεκόμενων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απελευθέρωση των IL-6 και TNF- α που μπορεί να προκαλέσει αυξημένη ανάκληση ουδετερόφιλων στο νεκρωτικό εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Τα ουδετερόφιλα έχουν επιβλαβή δράση δεδομένου ότι σχετίζονται αυτόν τον με διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και εγκεφαλικό τραυματισμό. Σχετίζονται **δε με** μεγαλύτερες περιοχές εμφράγματος σε άτομα που επηρεάζονται από εγκεφαλική ισχαιμία (Buck et al. 2008). Επιπλέον, η κατάσταση πώλωσης M1/M2 ασκεί επίδραση στο ρόλο των μικρογλοιακών κυττάρων και των μακροφάγων κατά την εγκεφαλική ισχαιμία. Η παρουσία ειδικών κυτοκινών στο τοπικό περιβάλλον (M1: IFN- γ , M2: TGF- β , IL-10) επηρεάζει την πώλωση σε έναν από τους δύο πιθανούς φαινότυπους. Το πλήθος του φαινοτύπου M1 συσχετίζεται με πιο σοβαρή ισχαιμική βλάβη, ενεργοποίηση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα-1, Hypoxia-inducible factors (HIF-1) και αυξημένη αναερόβια γλυκόλυση. Επίσης, η πώλωση της μικρογλοίας στον φαινότυπο M1 και η συνακόλουθη αυξημένη παραγωγή IL-23 προάγει τη στρατολόγηση και διέγερση των T γ δ κυττάρων, ενός υποσυνόλου ασυνήθιστων εγγενών T κυττάρων με διαφορετικό υποδοχέα T κυττάρων που θα μπορούσε να διαδραματίσει επίσημα λειτουργία κατά το οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό. Αυξανόμενα στοιχεία υποστηρίζουν ότι τα T γ δ κύτταρα είναι παθογόνα σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης εκκρίνοντας IL-17 και διεγείροντας τη φλεγμονή (Gelderblom et al. 2018). Από την άλλη πλευρά, ο επιπολασμός ενός τοπικού αντιφλεγμονώδους περιβάλλοντος που προάγεται από την έκκριση IL-10 και Transforming growth factor beta (TGF- β) ενθαρρύνει την πώλωση της μικρογλοίας στον αντιφλεγμονώδη φαινότυπο M2, ο οποίος έχει νευροπροστατευτική λειτουργία. Η απελευθέρωση αυτών των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών προάγει τη

στρατολόγηση ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων που διαδραματίζουν ανοσοτροποποιητικές και ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες στο τραυματισμένο εγκεφαλικό παρέγχυμα..

1.2 Βλαστικά κύτταρα:

Το ισχαιμικό ΑΕΕ αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας ενηλίκων παγκοσμίως. Η θρομβεκτομή και η θρομβόλυση είναι οι μόνες εγκεκριμένες θεραπείες, οι οποίες επικεντρώνονται στην εξάλειψη των αποφρακτικών παραγόντων στην αντιμετώπιση της οξείας φάσης (έως 6 ώρες), καθιστώντας μόνο αυτό το πλήθος των ασθενών κατάλληλο για θεραπεία. Δυστυχώς, στις μέρες μας δεν υπάρχουν ουσιαστικά θεραπείες που να υποστηρίζουν την αποτελεσματική αποκατάσταση των αισθητηριακών, κινητικών και γνωστικών ελλειμμάτων σε ασθενείς που επιβίωσαν από εγκεφαλικό και περισσότεροι από τους μισούς από αυτούς παραμένουν ανάπηροι σε διάφορους βαθμούς. Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για νέες στρατηγικές που θα υποστηρίξουν την αυθόρμητη αναγέννηση του κατεστραμμένου νευρικού ιστού και θα οδηγήσουν σε μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. (Coupland et al. 2017; Palma-Tortosa et al. 2021)

Ως βλαστικό κύτταρο ορίζεται το αδιαφοροποίητο κύτταρο που έχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε ιστικά εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους καθώς και τη δυνατότητα αυτοανανέωσης. Η συμπεριφορά τους ρυθμίζεται από το niche (θώκος) ώστε να παράγουν προβαθμίδες με αποτέλεσμα τελικά να διαφοροποιούνται. (Ota 2008)
Τα βλαστικά κύτταρα ταξινομούνται ως εξής (Σχήμα 5):

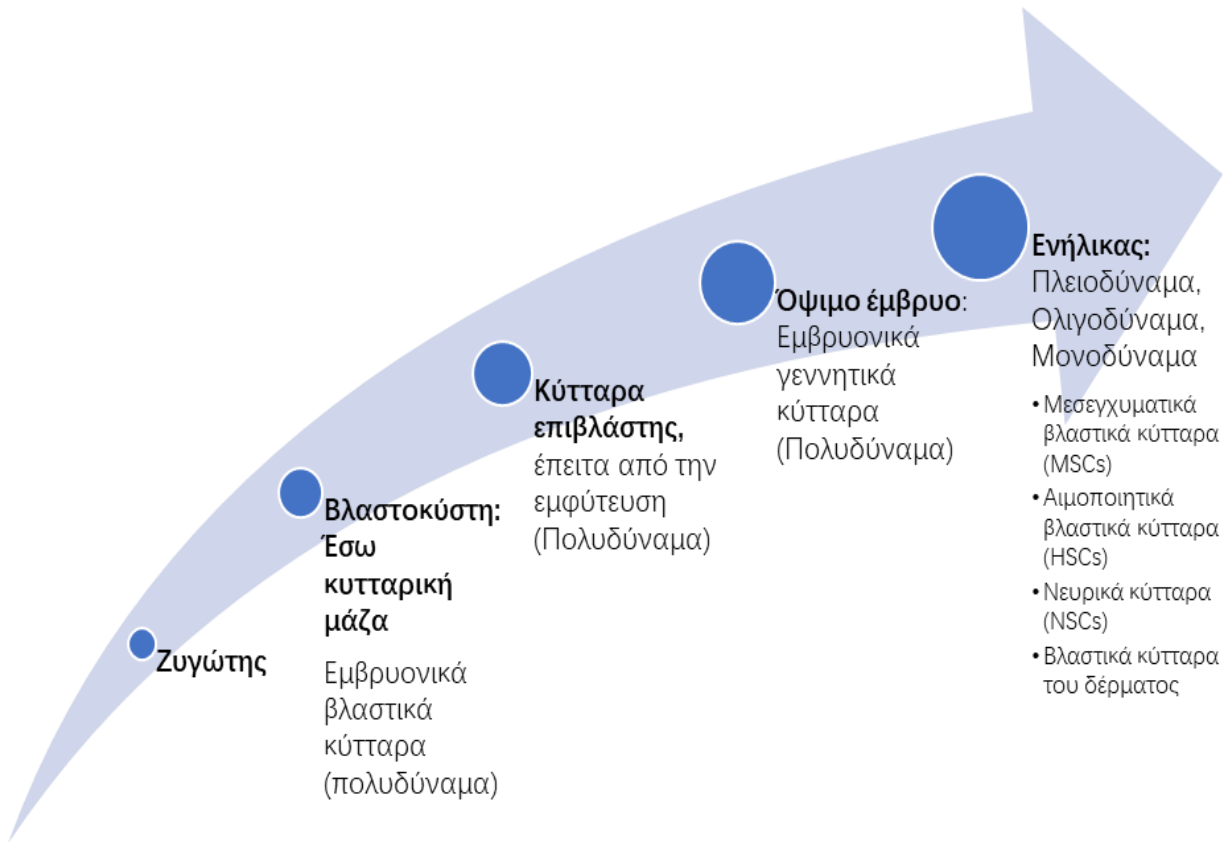
- Ολοδύναμα- Παντοδύναμα (Totipotent)
- Πολυδύναμα (Pluripotent):
 - Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs, Embryonic stem cells)
 - Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs, induced pluripotent stem cells)
- Ολιγοδύναμα – Πλειοδύναμα (Multipotent)

Τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε εμβρυικά κύτταρα αλλά και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς (πχ πλακούντας) . Ένα παράδειγμα τέτοιου κυττάρου είναι ο ζυγώτης. Έπειτα από 4 ημέρες, σχηματίζονται τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας, τα οποία είναι πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία μπορούν να

διαφοροποιηθούν προς κύτταρα όλων των βλαστικών στιβάδων αλλά όχι εξωεμβρυικών ιστών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα Embryonic stem cells (ESCs), πηγή των οποίων είναι τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης, πριν από την εμφύτευση και τα Induced pluripotent stem cells (iPSCs). Τα human embryonic stem cells (hESCs) διαφοροποιούνται περαιτέρω σε τρεις βλαστικές στιβάδες, μια διαδικασία που ονομάζεται γαστριδίωση, όπου τα κύτταρα πλέον είναι πλειοδύναμα (Multipotent Stem Cells). Σημειώνεται πως ανά βήμα μειώνεται και το δυναμικό διαφοροποίησης. (Ota 2008)

Τα Σωματικά βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs, Adult stem cells), είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρόντα σε όλο το σώμα και μπορούν να επαναπρογραμματιστούν ώστε να επιστρέψουν σε κατάσταση πολυδυναμίας. Για παράδειγμα με τη διαδικασία μεταφοράς ενός κυτταρικού πυρήνα ενήλικα σε κυτταρόπλασμα ενός ωοκυττάρου ή σε πολυδύναμο κύτταρο , όπως συνέβη στο πείραμα Dolly Sheep. (Ota 2008)

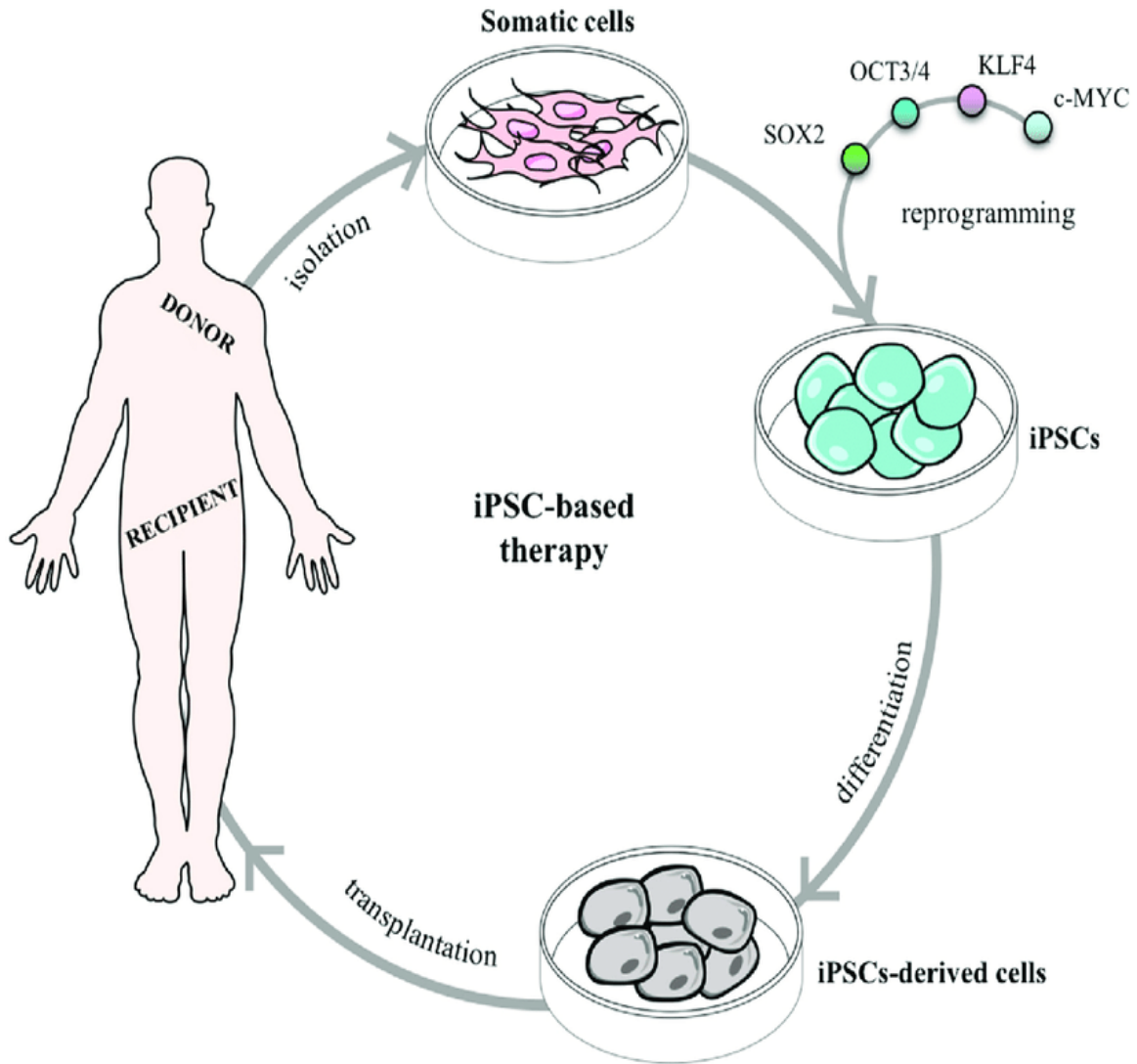
Ένα κομβικό σημείο στη θεραπεία με βλαστικά κύτταρα ήταν το 2006, όταν οι επιστήμονες Shinya Yamanaka, μαζί με τον Kazutoshi Takahashi, ανακάλυψαν ότι είναι δυνατός ο επαναπρογραμματισμός ενηλίκων βλαστικών κυττάρων στην πολυδύναμη κατάσταση (Εικόνα 2). Αυτή η διαδικασία ήταν η μεσολαβούμενη από ρετροϊό μεταγωγή ινοβλαστών ποντικού με τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες (Oct-3/4, Sox2, KLF4 και c-Myc) που εκφράζονται κυρίως σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και θα μπορούσαν να προκαλέσουν τη μεταβολή των ινοβλαστών σε πολυδύναμα κύτταρα. Αυτή η νέα μορφή βλαστοκυττάρων ονομάστηκε iPSCs. (K. Takahashi and Yamanaka 2013) Ένα χρόνο αργότερα, το πείραμα πέτυχε επίσης με ανθρώπινα κύτταρα. Μετά από αυτή την επιτυχία, η μέθοδος άνοιξε ένα νέο πεδίο στην έρευνα των βλαστοκυττάρων με μια γενιά γραμμών iPSC που μπορούν να προσαρμοστούν ώστε να είναι συμβατές με τον ασθενή.



Σχήμα 5 : Αλλαγές στην ισχύ των βλαστοκυττάρων στην ανάπτυξη του ανθρώπινου σώματος. Η ισχύς κυμαίνεται από πολυδύναμα κύτταρα της βλαστοκύστης έως μονοδύναμα κύτταρα ενός συγκεκριμένου ιστού σε ένα ανθρώπινο σώμα όπως το δέρμα, το ΚΝΣ ή ο μυελός των οστών

Είναι δυνατόν τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα να γίνουν και πάλι πολυδύναμα. Η διαδικασία του άμεσου επαναπρογραμματισμού μετατρέπει τα διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα σε γραμμές iPSCs που μπορούν να σχηματίσουν

όλους τους τύπους κυττάρων ενός οργανισμού. Η εν λόγω διαδικασία περιλαμβάνει έκφραση των ογκογονιδίων Klf4 και Myc. Τα iPSCs που προκύπτουν είναι αυτόλογα και μειώνουν τον κίνδυνο ανοσολογικής απόρριψης. Επειδή τα πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον και να διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε είδος κυττάρου, μπορούν να είναι μια απεριόριστη πηγή κυττάρων.



Εικόνα 2: Επαναπρογραμματισμός σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) σωματικών κυττάρων χρησιμοποιώντας παράγοντες Takahashi και Yamanaka (SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC) και χρήση των iPSCs περαιτέρω ως νέα θεραπευτική στρατηγική για μεταμόσχευση κυττάρων (Pereira et al. 2019).

Η καλύτερη πηγή κυττάρων για την παραγωγή iPSCs, είναι οι ινοβλάστες, (Turner and Grose 2010), ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης αιμοποιητικά κύτταρα περιφερικού αίματος, κερατινοκύτταρα, επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα που ανευρίσκονται στα ούρα. (Hilfiker et al. 2011)

Τα βλαστοκύτταρα για να είναι χρήσιμα στη θεραπεία, πρέπει να μετατραπούν στους επιθυμητούς τύπους κυττάρων. Η διαφοροποίηση των ESCs είναι ζωτικής σημασίας επειδή τα αδιαφοροποίητα ESCs μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό τερατώματος *in vivo*. Το εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής συμπεριφοράς, κάτι που αποτελεί πρόκληση *in vivo*. (Ota 2008). Για το σκοπό αυτό αυξητικοί παράγοντες ή άλλα μόρια χρησιμοποιούνται ώστε να επάγουν τη μετατροπή των βλαστοκυττάρων σε κατάλληλα προγονικά κύτταρα, τα οποία αργότερα θα δημιουργήσουν τον επιθυμητό τύπο κυττάρου. Τα περισσότερα κατευθυνόμενα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μιμούνται την ανάπτυξη της έσω κυτταρικής μάζας κατά τη γαστριδίωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα ενδοδέρματος, μεσοδέρματος και εξωδέρματος. Υπάρχει μια ποικιλία μοριακών οικογενειών που μπορεί να επηρεάσουν την εγκατάσταση βλαστικών στοιβάδων *in vivo*, όπως οι αυξητικοί παράγοντες ινοβλαστών (FGFs), οικογένεια Wnt ή η υπεροικογένεια μετασχηματιστικών αυξητικών παραγόντων-β (TGFβ) και μορφογενείς πρωτεΐνες των οστών (BMP). Για να προκύψει το επιθυμητό αποτέλεσμα αξίζει να σημειωθεί πως οι ανωτέρω παράγοντες θα πρέπει να είναι σε ισορροπία. (Turner and Grose 2010)

1.2.1 Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα:

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (PSC) πολλαπλασιάζονται επ άπειρον και διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των τριών βλαστικών στοιβάδων. Αυτές οι δύο ιδιότητες τα καθιστούν ελκυστικές πηγές για κυτταρικές θεραπείες για διάφορες ασθένειες και τραυματισμούς. Υπάρχουν δύο τύποι ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων PSCs (hPSCs) τα οποία διερευνήθηκαν για κλινική χρήση: εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESC) και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Ανθρώπινα ESCs (hESC) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από την ομάδα του James Thomson το

1998 (Thomson et al., 1998) δεκαεπτά χρόνια μετά τη δημιουργία των ESC ποντικών. Σημειώνεται πως η χρονική καθυστέρηση μεταξύ της δημιουργίας ESC ποντικού και ανθρώπου οφειλόταν σε σημαντικές διαφορές στη μορφολογία και τις συνθήκες καλλιέργειας. Τα hESC έχουν διερευνηθεί σε κυτταρικές θεραπείες για διάφορες ασθένειες και τραυματισμούς, όπως τραυματισμός του νωτιαίου μυελού, εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 (Ilic and Ogilvie 2016)

Όσον αφορά την κλινική χρήση, υπάρχουν δύο περιορισμοί σχετικά με hESCs:

- Ηθικά ζητήματα σχετικά με τη χρήση ανθρώπινων εμβρύων
- Ανοσολογική απόρριψη μετά τη μεταμόσχευση.

Προκειμένου να ξεπεραστούν τα εν λόγω εμπόδια, πολλές ομάδες προσπαθούν να δημιουργήσουν hESC από τα σωματικά κύτταρα του ίδιου του ασθενούς μέσω πυρηνικής μεταφοράς. Έτσι λοιπόν το 1996 με τη δημιουργία της Dolly the Sheep (Σχήμα 6) που χρησιμοποιούν πυρηνική μεταφορά η στρατηγική αυτή γνωστοποιήθηκε.

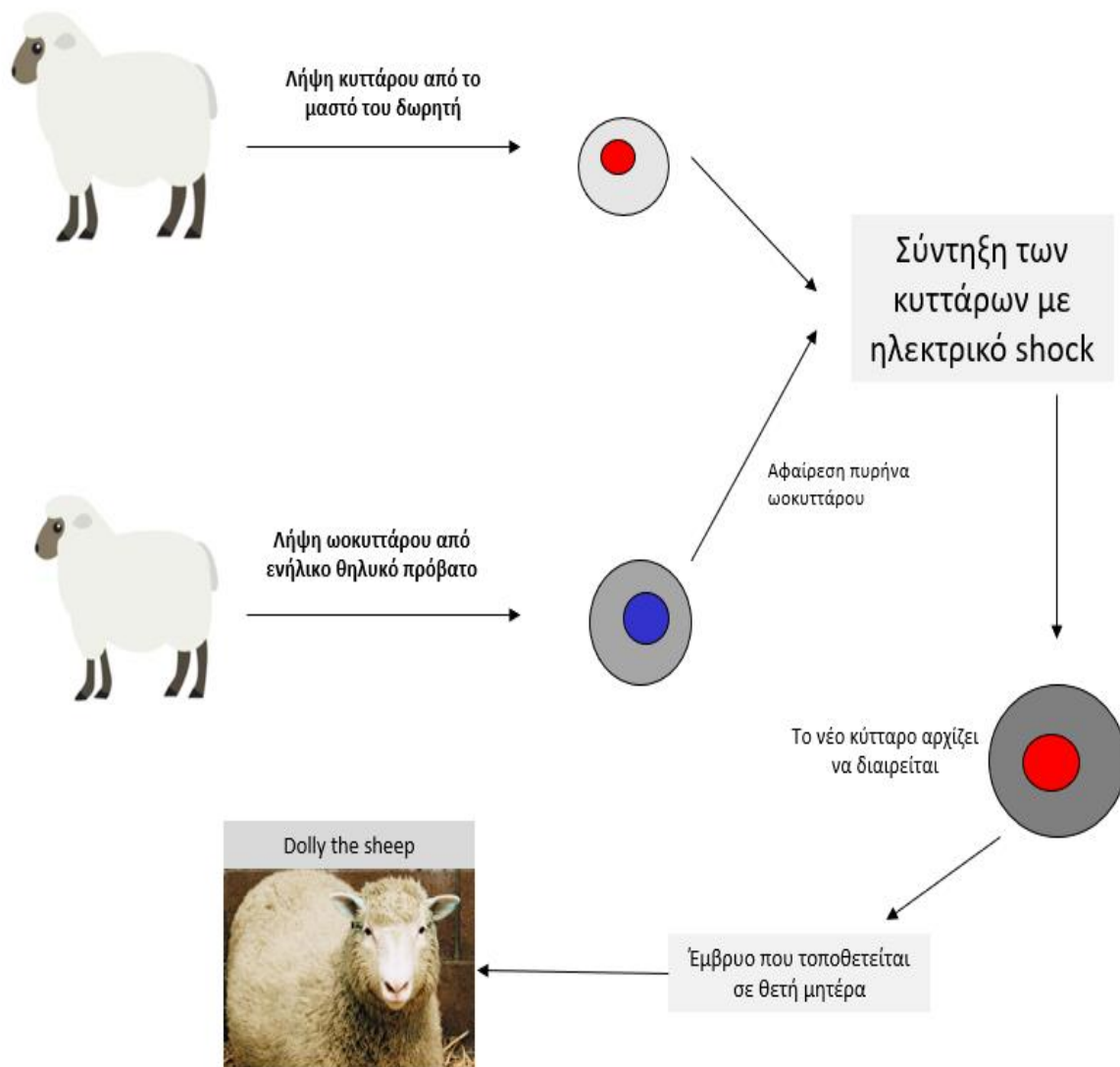
Τα ανθρώπινα iPSC (hiPSC) δημιουργήθηκαν το 2007 (Takahashi et al., 2007) και η εξέλιξη από το ποντίκι σε ανθρώπινα iPSC ολοκληρώθηκε στη σύντομη περίοδο του ενός έτους λόγω της συσσωρευμένης γνώσης από την έρευνα hESC. Από τότε, πολλές ομάδες προσπαθούν να φέρουν iPSC στους ασθενείς, και μερικά από αυτά δοκιμάζονται ήδη σε κλινικές δοκιμές

1.2.2 Προκλήσεις των PSCs:

Οι τρέχουσες προσδοκίες για την υλοποίηση της υπόσχεσης των ΠΣΚ είναι στο υψηλότερο που έχουν υπάρξει ποτέ. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν προκειμένου να τεθεί η τεχνολογία PSC στην αντίληψη πολλών περισσότερων ασθενών.

Τρεις φαίνεται πως είναι οι κύριες προκλήσεις:

- Ογκογένεση,
- Ανοσογονικότητα
- Ετερογένεια.



Σχήμα 6: Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της «Dolly». Το πυρηνικό υλικό αφαιρέθηκε από ένα ωοκύτταρο που ελήφθη από ένα ενήλικο θηλυκό πρόβατο και αντικαταστάθηκε από αυτό ενός somaticού κυττάρου από άλλο. Η σύντηξη και η ενεργοποίηση αυτού του ανακατασκευασμένου ζυγώτη οδήγησε σε ένα έμβρυο που μεταφέρθηκε χειρουργικά σε μια παρένθετη μητέρα όπου ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη μέχρι τον τερματισμό.

1.2.2A Ουγκογένεση:

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των PSC είναι η δυνατότητα επ' άπειρον πολλαπλασιασμού.

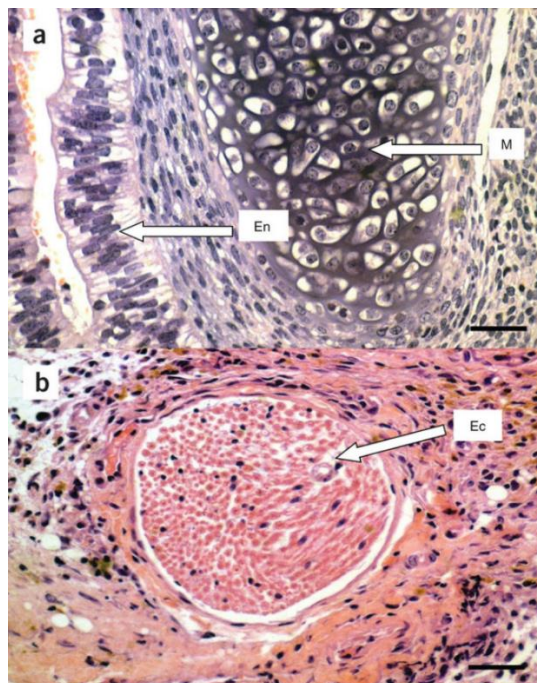
Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δυνατότητα προετοιμασίας δισεκατομμύρια διαφορετικών τύπων ανθρώπινων κυττάρων για μεταμόσχευση. Ωστόσο αν τα κύτταρα συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται ακόμα και μετά τη μεταμόσχευση, μπορεί να προκαλέσουν όγκους.

Μπορούν να ληφθούν τρεις περιπτώσεις (Σχήμα 7):

- Η διατήρηση αδιαφοροποίητων ή/και ανώριμων κύτταρων στα τελικά κυτταρικά προϊόντα που έχουν διαφοροποιηθεί από τα hPSC, δημιουργώντας έτσι τερατώματα ή όγκους λόγω λανθασμένου σχεδίου.
- Παραμονή ενεργών παραγόντων επαναπρογραμματισμού στα κύτταρα iPS, μπορεί να προάγουν την ογκογένεση.
- Τρίτον, η ογκογένεση μπορεί να είναι αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων που έχουν συμβεί κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας

Σχηματισμός Τερατωμάτων

Ο σχηματισμός τερατωμάτων (Εικόνα 3) είναι το σοβαρότερο πρόβλημα της μεταμόσχευσης hiPSCs και hESCs. Ακόμη και μερικά υπολειμματικά PSC μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό τερατώματος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στο νευρικό σύστημα, είναι η παραγωγή «νευρικής ροζέτας», οι οποίες αναπτύσσονται σε μορφή που μοιάζει με όγκο εάν γίνει ένεση *in vivo* (Malchenko et al. 2014) Η πρώτη σκέψη για τη μείωση του κινδύνου τερατώματος είναι η εγκατάσταση αποτελεσματικών μεθόδων *in vitro* κατευθυνόμενης διαφοροποίησης.



Εικόνα 3: Σχηματισμός τερατώματος. (α, β) Ιστολογικές τομές ενός τερατώματος, που σχηματίζονται από hESCs σε ποντικούς με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, που περιλαμβάνουν ιστούς αντιπροσωπευτικούς των τριών εμβρυϊκών βλαστικών στιβάδων: (α) ιστός χόνδρου (M) και κολονοειδές επιθήλιο (En), και (β) μελινωμένο νεύρο (Ec). (Χρώση με H&E). (Amit et al. 2011)

Οι Takahashi et al πέτυχαν καθαρότητα >95% στην πρώτη κλινική προσπάθεια μεταμόσχευσης όπου ο αμφιβληστροειδής προερχόμενος από hiPSC ήταν μελάγχρουν επιθήλιο που χορηγήθηκε σε ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, με τελικά λίγα εναπομείναντα κύτταρα να είναι θετικά για δείκτες μη διαφοροποιημένων κυττάρων (Yamanaka 2020). Το γεγονός ότι απαιτούνταν μικρός αριθμός κυττάρων μαζί με το γεγονός ότι η περιοχή μεταμόσχευσης ήταν εύκολα προσβάσιμη, οδήγησε σε κλινική δοκιμή το 2014, μόλις επτά χρόνια μετά την πρώτη αναφορά των hiPSC. Αντίθετα, σε πολλές άλλες περιπτώσεις, απαιτούνται πιο αυστηρές διαδικασίες καθαρισμού για την τήρηση των προτύπων ασφαλείας που ορίζονται για τις κλινικές δοκιμές. Για παράδειγμα, μια κλινική δοκιμή που χορηγεί hiPSC για τη νόσο του Πάρκινσον χρησιμοποιεί μια μέθοδο θετικής επιλογής του ντοπαμινεργικούς νευρώνες με αντίσωμα αντι-Χορίνης (Kikuchi et al. 2017)

Εκτός από τα υπολειμματικά PSC, όγκοι μπορεί επίσης να προκύψουν από διαφοροποιημένους απογόνους που εξακολουθούν να πολλαπλασιάζονται. Παράδειγμα αποτελεί μια μελέτη κάκωσης νωτιαίου μυελού, στην οποία μεταμοσχεύθηκαν προγονικά κύτταρα που προέρχονται από hiPSCs. (Nakamura and Okano 2013). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μεταμόσχευσης κυτταρικών σειρών προερχόμενων από hiPSCs, η παράλυση επανεμφανίστηκε λόγω του πολλαπλασιασμού των θετικών στη νεστίνη νευρικών προγονικών κυττάρων μετά από μεταμόσχευση. Επομένως, η προσεκτική επιλογή των κυτταρικών σειρών από τα iPSCs είναι ζωτικής σημασίας για την ασφαλή μεταμόσχευση. Η σηματοδότηση είναι ζωτικής σημασίας για την αυτοανανέωση των νευρικών προγονικών κυττάρων. Αναστέλλοντας αυτό το μονοπάτι με αναστολέα g-secretase, κατάφεραν να αναστείλουν την επέκταση του ανώριμων νευρικών προγονικών κυττάρων. Για περαιτέρω διασφάλιση της ασφάλειας, θα μπορούσε να σχεδιαστεί σκόπιμα αναντιστοιχία αλληλόμορφων human leukocyte antigen (HLA) μεταξύ των ληπτών και των μεταμοσχευμένων ώστε τα μεταμοσχευμένα κύτταρα να μπορούν να εξαλειφθούν έπειτα από τη διακοπή του ανοσοκατασταλτικού εάν παρατηρηθεί ανεπιθύμητος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Αυτός ο κίνδυνος είναι ειδικός για τα iPSC. Και οι τέσσερις παράγοντες επαναπρογραμματισμού έχουν συσχετιστεί με ογκογένεση, ιδιαίτερα βέβαια το c-Myc, που είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια σε ανθρώπινους καρκίνους και συχνά λειτουργεί ως μεταλλαξιόγonos παράγοντας. Τα χιμαιρικά ποντίκια κατασκευασμένα με iPSC που δημιουργήθηκαν από τη διαμόλυνση από ρετροϊό των τεσσάρων παραγόντων επαναπρογραμματισμού συχνά ανέπτυσαν όγκους (Okita et al., 2007). Ανιχνεύτηκε επανενεργοποίηση του ρετροϊού c-Myc σε αυτούς τους όγκους, ενώ τα χιμαιρικά ποντίκια με iPSC που δεν είχαν προκληθεί με ρετροϊό cMyc δεν εμφάνισαν τέτοιους όγκους. Μερικές φορές χρησιμοποιούνται άλλοι παράγοντες, πέραν των τεσσάρων παραγόντων, όπως μία κυρίαρχη αρνητική μετάλλαξη της p53, για αύξηση της αποδοτικότητας επαναπρογραμματισμού ή στη δημιουργία iPSC.

Με τη χρήση δε πλασμιδίων, το Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της επισωματικής έκφρασης των παραγόντων επαναπρογραμματισμού (Hong et al. 2009) καθώς ο ρόλος του EBNA1 στον καρκίνο είναι καλά τεκμηριωμένος.

Αυτός ο κίνδυνος είναι κοινός για τα hiPSC, τα hESC και οποιαδήποτε άλλα κύτταρα που επεκτείνονται in vitro πριν από τη μεταμόσχευση.

Παραδείγματα γενετικών αλλοιώσεων αποτελούν

- Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες: Οι οποίες ελέγχονται με καρυότυπο και τα κύτταρα με ανωμαλίες όπως χρωμοσωμική, έλλειψη, διπλασιασμός ή αναδιάταξη απορρίπτονται για χρήση σε κυτταρικές θεραπείες
- Η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων
- Μονήρεις μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων.

Στα hESC και hiPSCs, διπλασιασμοί των χρωμοσωμάτων 1, 12, 17 και 20 έχουν συχνά παρατηρηθεί μετά από μακροχρόνια επέκταση (Ampers et al. 2011). Οι μικρότερες γενετικές αλλοιώσεις, όπως μεμονωμένη παραλλαγή νουκλεοτιδίων (SNV) και παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (CNV), είναι πολλές φορές δύσκολο να αξιολογηθούν με ακρίβεια αποτελώντας πρόκληση. Μπορούν να ανιχνευθούν ωστόσο με next generation sequencing τεχνολογίες. Διαπιστώθηκε όμως πως τα hPSC συσσωρεύουν single-nucleotide variant (SNVs) σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 (tumor protein p53) (Merkle et al. 2017)

Οι γενετικές αλλοιώσεις στα PSC μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τύπους:

1. Αυτές που υπάρχουν πριν από την παραγωγή κυτταρικών σειρών: Η πλειονότητα αυτών των αλλαγών μπορεί να εντοπιστεί από το Whole Genome sequencing (WGS)
2. Αυτές που προκύπτουν μετά την παραγωγή: Η συχνότητα αυτού του αλληλίου είναι μικρότερη και μπορεί εύκολα να παραβλεφθεί. Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς αλγορίθμους που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις δεδομένων, αυτές οι μικρές αλλαγές μπορούν να εντοπιστούν, ωστόσο φαίνεται πως κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Το επόμενο ζήτημα που προκύπτει είναι η ερμηνεία τέτοιων ευρημάτων. Εάν κάποιος ανιχνεύσει μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο του καρκίνου, το πρωταρχικό ερώτημα είναι εάν η παρούσα μετάλλαξη αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο καρκίνου και έτσι αποτρέπει τη χρήση των PSC στην κυτταρική θεραπεία. Το COSMIC παρέχει μια λίστα γονιδίων που έχουν εμπλακεί αιτιολογικά στον καρκίνο, αλλά τα γονίδια που

αναφέρονται στην απογραφή αλλάζουν συνεχώς (Sondka et al. 2018) Βέβαια, δεν είναι όλες οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις των καρκινικών γονιδίων παθολογικές, όπως το *BRCA1*, που είναι ένα από τα πιο γνωστά καρκινικά γονίδια και φέρει πολυάριθμες μεταλλάξεις Πολλά από αυτά πιστεύεται ότι είναι καλοήθεις και δεν υποστηρίζουν προφυλακτική μαστεκτομή. (Yamanaka 2020)

Άλλη παράμετρος που περιπλέκει μια σαφή ανάλυση κινδύνου είναι πως ακόμα και σε υγιή άτομα έχουν ανιχνευθεί πολλαπλές μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με καρκίνο. Μπορούν να συμβούν είτε βλαστικές μεταλλάξεις, που κληρονομούνται από τα γεννητικά κύτταρα (ωάριο, σπερματοζωάριο) και ανευρίσκονται σε όλα τα κύτταρα του σώματος, είτε σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες εμφανίζονται μετά τη γονιμοποίηση.

Άλλα ζητήματα επίσης αποτελούν:

- Οι συνώνυμες μεταλλάξεις που μπορεί να είναι παθογόνες (Supek et al., 2014). Οι μονές νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις που δεν οδηγούν σε αλλαγή αλληλουχιών αμινοξέων θεωρούνται σιωπηλές αλλά μπορεί να προκαλέσουν παθολογία, όπως στην περίπτωση αλλαγής και λειτουργίας του DNA (πχ μάτισμα)
- Μεταλλάξεις σε διαγονιδιακές περιοχές μπορεί να είναι παθογόνες (Yamanaka 2020) Οι μη κωδικοποιούμενες περιοχές καταλαμβάνουν το 98% του γονιδιώματος και ονομάστηκαν «junk» DNA. Ωστόσο, τελικά έχουν σημαντικούς ρόλους όπως η σύνδεση με μεταγραφικούς παράγοντες και η κωδικοποίηση μη κωδικοποιημένων RNA. Το αποτέλεσμα λοιπόν των μεταλλάξεων σε αυτές τις περιοχές θα μπορούσε να αλλάξει τη μεταγραφή των καρκινικών γονιδίων, αποβαίνοντας καταστροφικές.

Οι παθογόνες μεταλλάξεις στο *BRCA1* έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης όγκου στο στήθος και στις ωθήκες. Ακόμη και εάν υπάρχει μετάλλαξη, οι όγκοι δεν ανιχνεύονται στην παιδική ηλικία όπως επίσης δεν υπάρχει απόδειξη ότι αυτά τα άτομα έχουν υψηλότερο κίνδυνο ογκογένεσης σε άλλους ιστούς όπως ο νευρικός ιστός ή ο καρδιακός μυς (Dullens et al. 2020). Έτσι χρήζει συζήτησης εάν η ίδια μετάλλαξη επηρεάζει τη θεραπευτική χρήση των πολυδύναμων κυττάρων για διάφορες ασθένειες

που αφορούν άλλες εντοπίσεις όπως η νόσος του Πάρκινσον, ο τραυματισμός του νωτιαίου μυελού και η καρδιακή ανεπάρκεια.

1.2.2B Ανοσογονικότητα:

Όπως είναι γνωστό η απόρριψη στα αλλομοσχεύματα έχει ξεπεραστεί από τη χρήση ανοσοκατασταλτικών. Βέβαια, οι ασθενείς δεσμεύονται στη λήψη ισόβιας ανοσοκαταστολής, υποφέροντας τελικά από σοβαρές παρενέργειες, όπως λοιμώξεις. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένοι ιστοί πιο ανθεκτικοί ανοσολογικά όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα και ο οφθαλμός, όπου η διάρκεια λήψης ανοσοκατασταλτικών μπορεί να μειωθεί υπό συνθήκες. Το προνόμιο αυτό δυστυχώς μπορεί να χαθεί σε περιπτώσεις όπως η γήρανση, το τραύμα ή άλλες βλάβες (Yamanaka 2020)

Η ανοσολογική απόρριψη είναι αμφιλεγόμενη και αποτελεί μια άλλη πρόκληση στην κυτταρική θεραπεία με iPSCs, παρόλο που δημιουργούνται από τα κύτταρα των ίδιων των ασθενών παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα αυτόλογης μεταμόσχευσης. Τα αυτόλογα iPSC και τα παράγωγα μοσχεύματα μπορεί να παρέχουν μια ιδανική επιλογή για μεταμόσχευση όσον αφορά την παράκαμψη της ανοσολογικής απόρριψης. Στην κλινική μελέτη για την ωχρά κηλίδα (Mandai et al., 2017) ενδείξεις μεταμοσχευμένων κυττάρων εντοπίστηκαν με απεικονιστικές αναλύσεις περισσότερα από 2 χρόνια μετά την επέμβαση, χωρίς εμφανή σημεία απόρριψης.

Στην περίπτωση σχηματισμού τερατωμάτων, παρατήθηκαν σημεία απόρριψης, όπως διήθηση από T λεμφοκύτταρα.. Υπάρχουν βέβαια και άλλες μέθοδοι για την αποφυγή απόρριψης, οι οποίες είναι οι εξής:



Σχήμα 7 : Συνοπτική περιγραφή των τριών περιπτώσεων της ογκογένεσης.

Τράπεζες απλότυπου HLA hPSCs

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται ουσιαστικά στην αντιστοίχιση του HLA απλότυπου, μια προσέγγιση που χρησιμοποιείται σήμερα και ευρέως στη μεταμόσχευση

αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Εκατομμύρια δωρητές είναι εγγεγραμμένοι σε παγκόσμιες τράπεζες μυελού των οστών. Δείγματα αίματος ομφάλιου λώρου είναι επίσης διαθέσιμα για ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία ή και άλλες αιματολογικές διαταραχές. Ωστόσο, η προετοιμασία γραμμών hPSC με χιλιάδες μοναδικούς απλότυπους HLA δεν είναι πρακτική. Στο Ηνωμένο Βασίλειο προτάθηκε ότι 10 κυτταρικές σειρές hiPSC ομόζυγες με κοινούς τύπους HLA που επιλέγονται από 10.000 δότες παρείχαν ένα αξιόλογο HLA-A, HLA-B και HLA-DR match. (Taylor et al. 2005) Η αναγκαιότητα για αντιστοίχιση HLA προκειμένου να αποτραπεί η απόρριψη ποικίλλει ανάλογα με την τελική εφαρμογή, όπως για παράδειγμα το τελικό όργανο στόχος. (Yamanaka 2020)

HLA Cloaking Approach

Πιο πρόσφατα, μια άλλη προσέγγιση εμφανίστηκε με την έλευση της μεθόδου Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) (Σχήμα 8). Τα γονίδια HLA μπορούν με αυτό τον τρόπο να απενεργοποιηθούν. Όλα τα γονίδια MHC I, συμπεριλαμβανομένων των HLA-A, HLA-B και το HLA-C, μπορούν να απενεργοποιηθούν διαγράφοντας το γονίδιο βήτα 2-μικροσφαιρίνης (B2M). Ομοίως και για τα HLA-DP, HLA-DQ και HLA-DR μπορούν να κατασταλούν με τη διαγραφή ενός από τους τέσσερις μεταενεργοποιητές που είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφή της κατηγορίας II.

Ένα ζήτημα που μπορεί να προκύψει αποτελεί η έλλειψη MHC κατηγορίας I, ωστόσο, θα είχε ως αποτέλεσμα τη λύση από Natural Killer (NK) κύτταρα, ένα φαινόμενο γνωστό ως ‘missing self recognition’ (Ichise et al. 2017). Τα κύτταρα NK φέρουν ανασταλτικούς υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας NKG2A. Τα μόρια MHC κατηγορίας I λειτουργούν ως συνδέτες αυτών των υποδοχέων, και επομένως κύτταρα που εκφράζουν αυτή την κατηγορία δεν προσβάλλονται. Το ζήτημα αυτό μπορεί να λυθεί με την εισαγωγή ενός χμαιρικού μορίου που αποτελείται από HLA-E και B2M. Το HLA-E είναι ένα μόριο κατηγορίας MHC I με περιορισμένους πολυμορφισμούς, που δεσμεύει και ενεργοποιεί NKG2A.

Άλλη στρατηγική για την απόκρυψη HLA είναι η διαγραφή των δύο αλληλόμορφων των HLA-A και HLA-B και ενός του HLA-C (Yamanaka 2020). Τα

HLA-A και HLA-B είναι κρίσιμα για την ανοσολογική απόρριψη και έτσι, η διαγραφή τους καταστέλλει την ενεργοποίηση των CD8⁺ φονικών T κυττάρων. Το υπόλοιπο HLA-C θα πρέπει να δεσμεύει το Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) καταστέλλοντας τα NK κύτταρα. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να δημιουργηθεί αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας HLA-ομοζυγωτικές σειρές, καθώς απαιτούνται μόνο δύο καθοδηγητικά RNA (ένα για το HLA-A και ένα για το HLA-B) Πλεονέκτημα αποτελεί επίσης ότι οι απλότυποι HLA-C είναι λιγότερο διαφορετικοί από τους HLA-A ή τους HLA-B, οπότε μπορούν να καλύψουν ευκολότερα το μεγαλύτερο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού.(Yamanaka 2020)

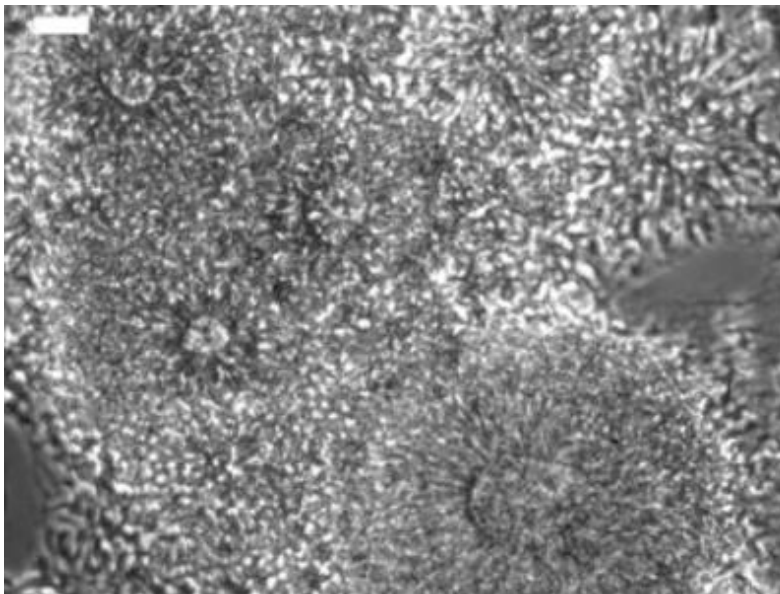
1.2.2Γ Ετερογένεια

Δύο είναι οι κοινές ιδιότητες των PSCs: Η πολυδυναμία και η δυνατότητα πολλαπλασιασμού επ' άπειρον. Όμως κάθε κυτταρική σειρά PSCs δεν είναι πανομοιότυπη με μια άλλη ως προς τη μορφολογία, την γονιδιακή έκφραση, την καμπύλη ανάπτυξης και την τάση διαφοροποίησης. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο στις κυτταρικές θεραπείες. Ετερογένεια έχει αναφερθεί τόσο σε σειρές hESC όσο και σε hiPSCs. Το γενετικό υπόβαθρο είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας στον προσδιορισμό της ετερογένειας στη γονιδιακή έκφραση. (Choi 2016) Σημειώνεται πως ορισμένες γραμμές iPSCs εμφανίζουν περιορισμούς στη ικανότητα διαφοροποίησης.

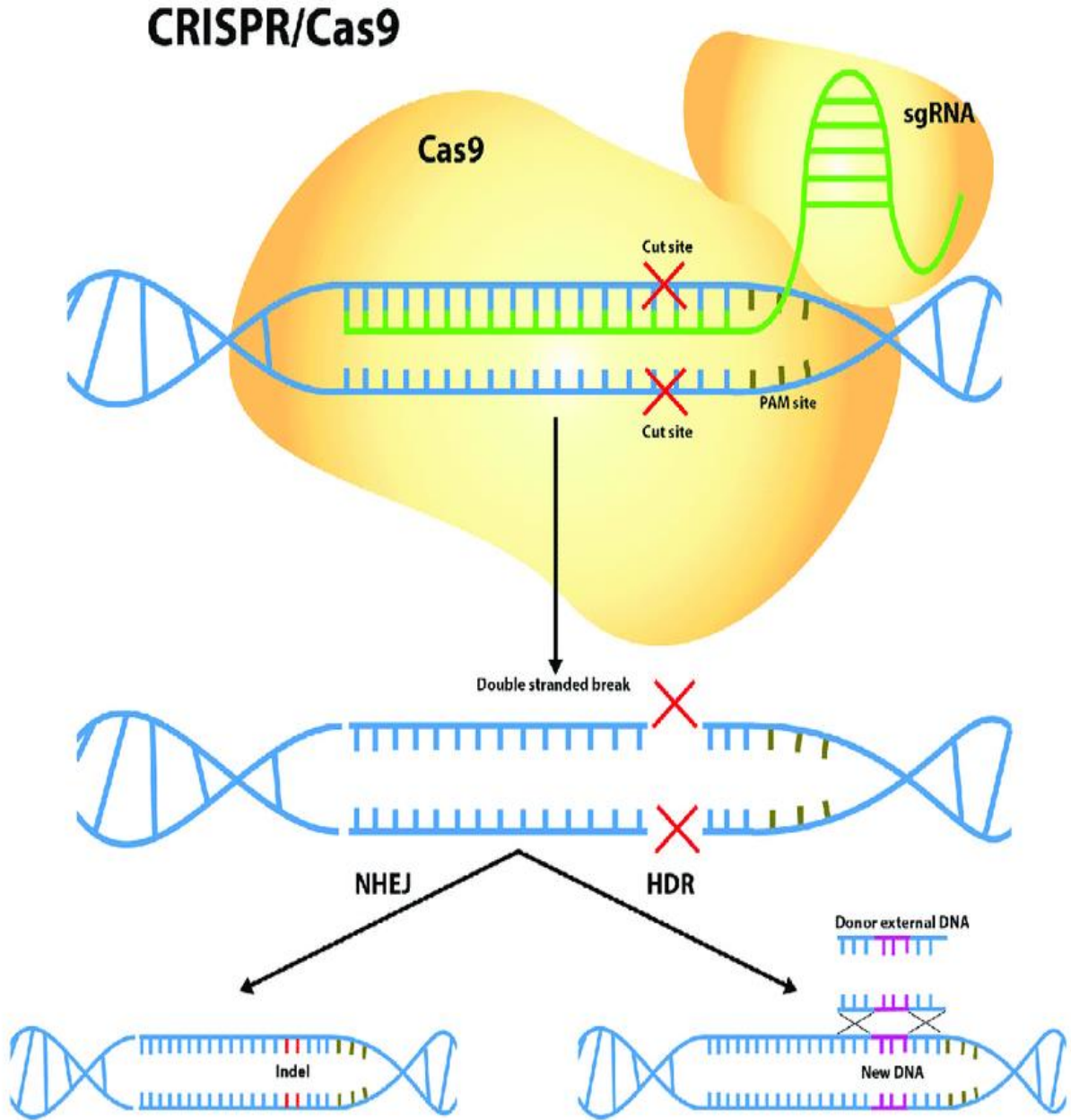
Για την επίλυση της ετερογένειας, ορισμένοι ερευνητές πρότειναν την μετατροπή των hPSC σε κατάσταση “naïve”. Σε συμβατικές συνθήκες καλλιέργειας με αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 2 (FGF2), τα hPSCs μοιάζουν με μεταεμφυτευτικούς επιβλάστες, όσον αφορά στη γονιδιακή έκφραση και την επιγενετική κατάσταση. Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως “primed”. Αντίθετα, τα ESC και τα iPSC του ποντικού μοιάζουν με την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης ή προεμφυτευτικής επιβλάστης, μια φάση που χαρακτηρίζεται “naïve”. Η ικανότητα διαφοροποίησης των hPSC μπορεί να ενισχυθεί με τη μετατροπή τους σε “naïve” . Για την μετατροπή αυτή έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις όπως η χρήση συνδυασμού χημικών αναστολέων αυξητικών παραγόντων (Theunissen et al. 2014)

Υπάρχουν διάφορες ανησυχίες σχετικά με τα naïve PSCs. Οι βασικότερες είναι οι εξής:

- Η γενετική τους ακεραιότητα. Σε τα αφελή ανθρώπινα κύτταρα που δημιουργήθηκαν από πέντε αναστολείς κινάσης, παρατηρήθηκαν επανειλημμένα χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Theunissen et al., 2014)., πιθανά λόγω του υψηλού ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης, είτε την μη επιδιόρθωση του DNA
- Η απώλεια της αποτύπωσης, με κύριο γνώρισμα την υπομεθυλίωση. Μετά την εκ νέου διαφοροποίηση και πάλι σε primed κατάσταση, οι περισσότερες γονιδιωματικές περιοχές επαναμεθυλιώνονται. Αυτό δυστυχώς δεν συμβαίνει για τα γονίδια αποτύπωσης. (Theunissen et al., 2016). Η μη φυσιολογική αποτύπωση μπορεί να εμποδίσει τις κλινικές εφαρμογές των “Naïve” hPSC.



Εικόνα 4: Μικροφωτογραφία νευρικών ροζετών που παρατηρήθηκαν 12 ώρες μετά την επίστρωση καθαρισμένων neurosphere-like structures (NLS) . Οι νευρικές ροζέτες είναι αναπτυξιακές μορφές των νευροπρογονικών κυττάρων σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων που μοιάζουν με λουλούδια, εκφράζουν πολλές πρωτείνες των νευροεπιθηλιακών κυττάρων του νευρικού σωλήνα και ανευρίσκονται σε πολλούς νευρολογικούς όγκους. Οι νευροπρογονικοί παράγοντες στις νευρικές ροζέτες μπορούν να διαφοροποιηθούν in vivo προς νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα. (Malchenko et al. 2014; Wilson and Stice 2006)



Σχήμα 8: Μηχανισμοί γονιδιακής επεξεργασίας με τη μεσολάβηση του CRISPR-Cas9. Ένα single-guide RNA (sgRNA) αναγνωρίζει μια γονιδιωματική περιοχή ακολουθούμενη από 5'-NGG-3' PAM αλληλουχία, η οποία στρατολογεί την ενδονουκλεάση Cas9 DNA. Αυτό εισάγει ένα δίκλωνο σπάσιμο που επιδιορθώνεται με (i) μη ομόλογη σύνδεση άκρου (NHEJ), (επιρρεπή σε σφάλματα) ή με (ii) επιδιόρθωση κατευθυνόμενη από ομολογία (HDR). (Cribbs and Perera 2017)

2. Κυτταρική θεραπεία

Όπως έχει προαναφερθεί το ΙΑΕΕ χαρακτηρίζεται από οξεία απώλεια νευρώνων, αστροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων καθώς και διαταραχή της συναπτικής αρχιτεκτονικής λόγω απόφραξης αρτηριακού αγγειακού κλάδου. Η ενδογενής κυτταρική αντικατάσταση ενός ενήλικου ασθενούς δεν είναι αρκετή για την επιδιόρθωση του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) λόγω της περιορισμένης ικανότητας και του ρυθμού ανανέωσης νευρικών κυττάρων. Επειδή οι τρέχουσες θεραπείες για το ΙΑΕΕ περιορίζεται λόγω του στενού χρονικού τους παραθύρου και της έλλειψης αναγεννητικών οφελών, χρειάζονται νέες θεραπείες για το εγκεφαλικό για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια. Η θεραπεία με βλαστοκύτταρα έχει αναδειχθεί ως μια νέα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία του εγκεφαλικού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι βλαστικών κυττάρων, όπως τα των εμβρυϊκά (ESCs), τα νευρικά (NSCs) και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs).

2.1 Ορισμός:

Οι θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα ορίζονται ως οποιαδήποτε θεραπεία για μια ασθένεια ή μια ιατρική κατάσταση που περιλαμβάνει ουσιαστικά τη χρήση οποιουδήποτε τύπου βιώσιμων ανθρώπινων βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (ESCs), των iPSCs και των ενήλικων βλαστοκυττάρων είτε για αυτόλογες είτε για αλλογενείς θεραπείες (Zhang et al. 2020) Τα βλαστοκύτταρα προσφέρουν την τέλεια λύση όταν υπάρχει ανάγκη για μεταμόσχευση ιστών και οργάνων μέσω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται στους συγκεκριμένους τύπους κυττάρων που απαιτούνται για την επισκευή των ασθενών ιστών.

2.2 Παρούσα κατάσταση Κυτταρικών Θεραπειών:

Η κυτταρική θεραπεία ως μέθοδος αναγεννητικής ιατρικής θεωρείται ένας από τους πιο πολλά υποσχόμενους κλάδους στους τομείς της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης, προσφέροντας άπειρες δυνατότητες θεραπείας ακόμα και για ορισμένες από τις πιο απειλητικές για τη ζωή παθήσεις. Η αναγεννητική ιατρική αποτελεί λοιπόν μια ανερχόμενη λύση στην υγειονομική περίθαλψη με ιδιαίτερο στόχο την επιδιόρθωση και πιθανή αντικατάσταση των άρρωστων κυττάρων, ιστών ή οργάνων με σκοπό την ανάκτηση της φυσιολογικής λειτουργίας. Η προοπτική χρήσης της αναγεννητικής ιατρικής ως εναλλακτικής λύσης στις συμβατικές θεραπείες γίνεται όλο και πιο πιθανή λόγω της έντονης ενασχόλησης των ερευνητικών κοινοτήτων στη μελέτη των πιθανών εφαρμογών σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος του Parkinson, πολλαπλή σκλήρυνση κλπ), διαβήτη, οφθαλμολογικές (εκφύλιση της ωχράς κηλίδας) και δερματολογικές παθήσεις (Epidermolysis Bullosa) .(Aly 2020)

Παρά τον αυξημένο αριθμό δημοσιεύσεων που αναφέρουν επιτυχημένες περιπτώσεις θεραπειών με βλαστοκύτταρα, ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δοκιμών δεν έχουν ακόμη λάβει πλήρη έγκριση για επικύρωση. Οι μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών αποτελούν την πιο καθιερωμένη θεραπεία με βλαστοκύτταρα για τη θεραπεία αιματολογικών διαταραχών και διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος. Η πολυπλοκότητα των θεραπειών που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα συχνά οδηγεί τους ερευνητές στην αναζήτηση πηγών βλαστοκυττάρων με μέγιστη ασφάλεια, σταθερότητα και προσβασιμότητα που έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί σε πολλές γενεές. Επομένως, είναι υψίστης σημασίας η προσεκτική επιλογή του τύπου βλαστοκυττάρων που είναι κατάλληλο για κλινική εφαρμογή .(Aly 2020)

Πολλοί συγγραφείς θεωρούν τα ενήλικα βλαστοκύτταρα το χρυσό πρότυπο στις θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα έδειξαν σημάδια κλινικής επιτυχίας ειδικά σε αιμοποιητικές μεταμοσχεύσεις. Σε αντίθεση με τα ESCs, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα δεν υπόκεινται σε αμφιλεγόμενες απόψεις σχετικά με την προέλευσή τους. Το γεγονός ότι η παραγωγή ESCs περιλαμβάνει την καταστροφή ανθρώπινων εμβρύων τα καθιστά απαράδεκτα για ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού για ηθικές και θρησκευτικές πεποιθήσεις.

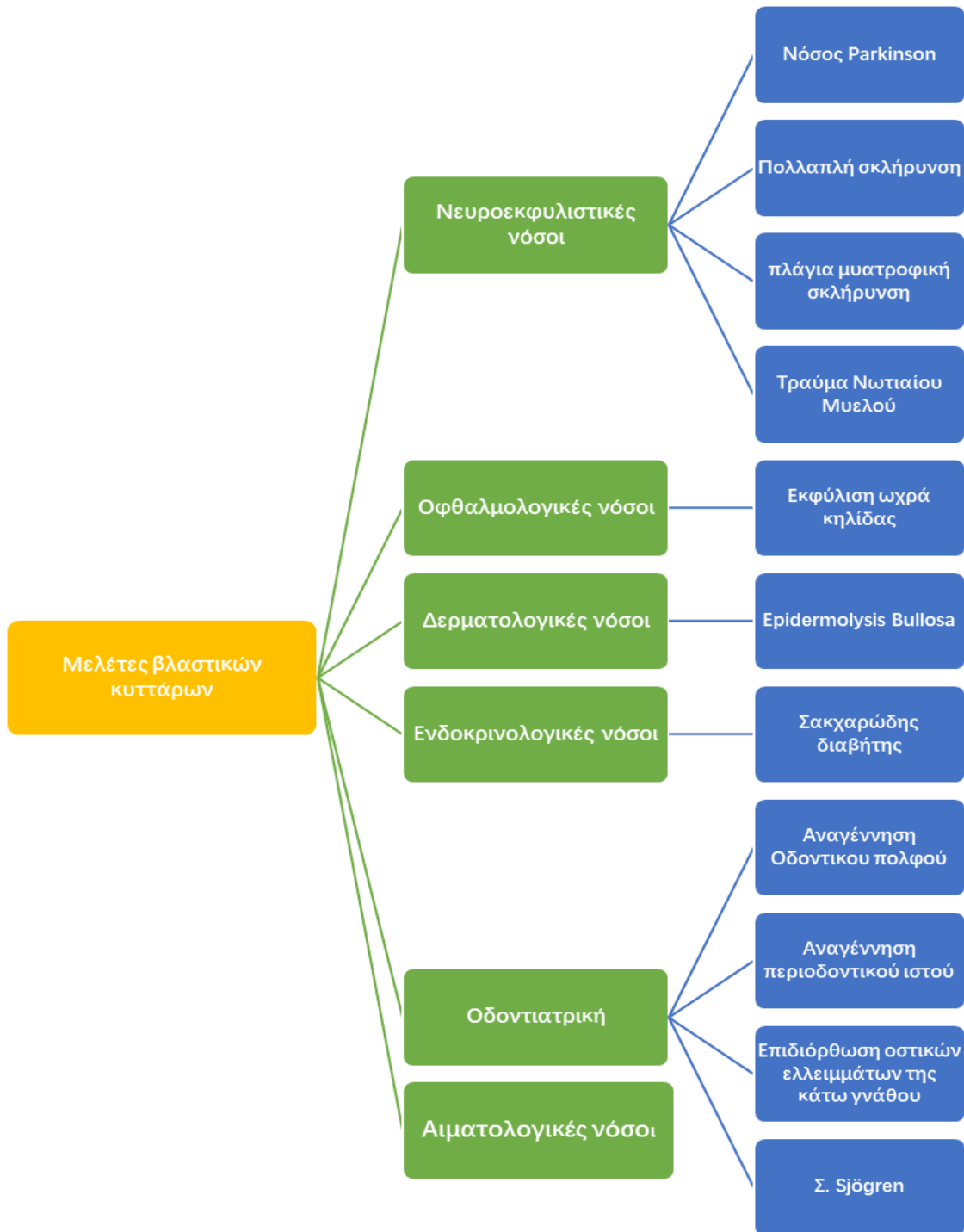
3. Παλαιότερα και νέα δεδομένα για τα Βλαστικά κύτταρα

3.1 Σημείο καμπής στην έρευνα για τα βλαστικά κύτταρα:

Αδιαμφισβήτητα το σημείο καμπής ήταν το 2006 όταν η Shinya Yamanaka πέτυχε τη δημιουργία κυττάρων που έχουν τις ίδιες ιδιότητες και γενετικό προφίλ των ESCs. γνωστά ως iPSCs από πλήρως διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα ινοβλάστες (K. Takahashi and Yamanaka 2013) Τα iPSCs έχουν μεταμορφώσει το πεδίο της έρευνας για τα βλαστοκύτταρα, λόγω του μεγάλου δυναμικού διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε από τα βλαστικά στρώματα ακριβώς όπως τα ESCs και αποκλείοντας τυχόν ηθικά ζητήματα. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας iPSCs έχει δημιουργήσει έναν καινοτόμο τρόπο ταυτοποίησης και θεραπείας ασθενειών. Δεδομένου ότι μπορούν να δημιουργηθούν αυτόλογα iPSCs ελαχιστοποιούν πολλές δυσκολίες όπως η απόρριψη του μοσχεύματος. Ωστόσο, πρέπει ακόμη να αντιμετωπιστούν ορισμένες προκλήσεις προτού τα κύτταρα που προέρχονται από iPSC μπορούν να εφαρμοστούν σε κυτταρικές θεραπείες. Τέτοιες προκλήσεις περιλαμβάνουν: την ανίχνευση και αφαίρεση ατελώς διαφοροποιημένων κυττάρων, αντιμετώπιση των γονιδιωματικών και επιγενετικών αλλοιώσεων στα δημιουργούμενα κύτταρα και υπερνίκηση της ογκογονικότητας αυτών των κυττάρων που θα μπορούσε να προκύψει κατά τη μεταμόσχευση (Aly 2020)

Μέχρι σήμερα, ορισμένες θεραπείες βασισμένες σε βλαστοκύτταρα που χρησιμοποιούν ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι κλινικά διαθέσιμες και περιλαμβάνουν κυρίως μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και δερματικά μοσχεύματα για σοβαρά εγκαύματα. Επί του παρόντος, υπάρχουν πάνω από 3.000 δοκιμές που αφορούν τη χρήση βλαστικών κυττάρων ενηλίκων που είναι καταχωρημένες στο Διεθνές Μητρώο Κλινικών Δοκιμών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Σχήμα 9). Επιπλέον, καταγράφονται επίσης οι αρχικές δοκιμές που αφορούν τις νέες και θεραπείες που βασίζονται σε iPSCs. Στην πραγματικότητα, η πρώτη κλινική προσπάθεια με χρήση iPSC ανέφερε επιτυχημένα αποτελέσματα στη θεραπεία της

εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (Brown 2008). Η επιτέλεση αυξημένου πλήθους μελετών θα διευκολύνει την κατανόηση των χρονικών πλαισίων που απαιτούνται για την επίτευξη επιτυχημένων θεραπειών και θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των ασθενειών.

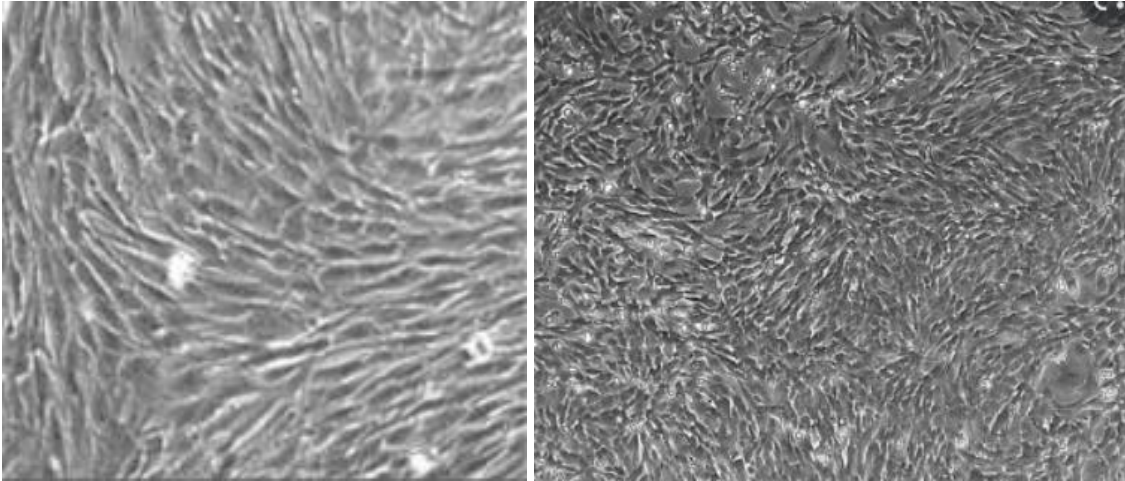


Σχήμα 9 ; Ενδεικτικές παθήσεις που σχετίζονται με την έρευνα των βλαστικών κυττάρων.

3.2 Τράπεζες Βλαστοκυττάρων:

Η ικανότητα αποθήκευσης αυτόλογων βλαστοκυττάρων στην πιο ισχυρή τους κατάσταση για μελλοντική χρήση είναι ένα βασικό βήμα για τις θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα. Για να θεωρηθεί έγκυρη, οποιαδήποτε νέα θεραπεία θα πρέπει να είναι εξίσου αποτελεσματική με τη συμβατική θεραπεία. Συνεπώς, κατά την αξιολόγηση ενός τύπου βλαστοκυττάρων για εφαρμογή σε κυτταρικές θεραπείες, ζητήματα όπως η απόρριψη του ανοσοποιητικού συστήματος και η άμεση διαθεσιμότητα μεγάλου αριθμού βλαστοκυττάρων θα πρέπει να έχουν διευθετηθεί πριν από την κλινική εφαρμογή. Πρόσφατα, το Ινστιτούτο Αναγεννητικής Ιατρικής της Καλιφόρνια (CIRM) εγκαινίασε ένα αποθετήριο iPSCs για να παρέχει στους ερευνητές ευέλικτες κυτταρικές σειρές iPSCs προκειμένου να επιταχύνουν τις θεραπείες με βλαστοκύτταρα μέσω της μελέτης γενετικών ποικιλιών και μοντελοποίησης ασθενειών. Μια άλλη σημαντική πηγή για την τράπεζα βλαστοκυττάρων είναι ο ομφάλιος λώρος (Εικόνα 3), ο οποίος κρυοσυντηρείται αμέσως μετά τη γέννηση επιτρέποντας έτσι στα βλαστοκύτταρα να αποθηκεύονται επιτυχώς και να είναι έτοιμα για χρήση. Επίσης, τα βλαστοκύτταρα των ανθρώπινων απολεπισμένων νεογιλών δοντιών (SHEDs) (Εικόνα 3) είναι πιο ελκυστικά ως πηγή τράπεζας βλαστοκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε περισσότερους κυτταρικούς τύπους από τα υπόλοιπα ενήλικα βλαστοκύτταρα και οι διαδικασίες απομόνωσης και κρυοσυντήρησής τους δεν είναι τόσο περίπλοκες. (N. M. Li et al. 2019) Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα των τραπεζών SHED είναι η ασφαλισμένη αυτόλογη μεταμόσχευση που αποφεύγει την πιθανότητα ανοσοαπόρριψης. Σε αντίθεση με τα βλαστοκύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, τα SHED έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε συνδετικούς ιστούς, νευρικούς και οδοντικούς ιστούς (T. Li et al. 2016)

Συμπερασματικά, ο απότερος στόχος της τράπεζας βλαστοκυττάρων είναι η δημιουργία αποθήκης υψηλής ποιότητας σειρών βλαστοκυττάρων για μελλοντική χρήση στη θεραπεία.



Εικόνα 3: Phase contrast μικροσκόπηση όπου απεικονίζονται βλαστοκύτταρα ομφαλίου λώρου (αριστερά) και βλαστοκύτταρα των ανθρώπινων απολεπισμένων νεογιλών δοντιών (SHEDs) (δεξιά)

3.3 Τρέχουσες κατευθυντήριες γραμμές για θεραπείες βασισμένες σε βλαστοκύτταρα

Λόγω του αυξημένου αριθμού κλινικών δοκιμών που χρησιμοποιούν βλαστοκύτταρα ως θεραπευτικές προσεγγίσεις, η ανάγκη για ανάπτυξη ρυθμιστικών κατευθυντήριων γραμμών για την ασφάλεια των ασθενών γίνεται όλο και πιο θεμελιώδης. Ωστόσο, επειδή αυτές οι θεραπείες είναι ακόμα πρώιμες, τις καθιστούν αντικείμενο επιστημονικών, ηθικών και νομικών αντιπαραθέσεων που δεν έχουν ακόμη ρυθμιστεί. Οι κορυφαίες χώρες στον τομέα έχουν επινοήσει κατευθυντήριες γραμμές που εξυπηρετούν αυτόν τον σκοπό. Πρόσφατα, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) δημοσίευσε ρυθμιστικές κατευθυντήριες γραμμές για να διασφαλίσει ότι αυτές οι θεραπείες είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές (X. Li et al. 2016). Το 2014, έλαβε χώρα μια ριζική μεταρρύθμιση στην Ιαπωνία με την ψήφιση δύο νέων νόμων που επέτρεπαν την υπό όρους έγκριση θεραπειών που βασίζονται σε κύτταρα μετά από κλινικές δοκιμές πρώιμης φάσης, υπό την προϋπόθεση ότι παρέχονται δεδομένα κλινικής ασφάλειας από τουλάχιστον δέκα ασθενείς. Τέλος, οι ρυθμιστικές αρχές απαιτούν τώρα την εφαρμογή πρωτοκόλλων κανονισμών τυποποίησης και ασφάλειας για κυτταρικά προϊόντα, τα οποία περιλαμβάνουν τη χρήση μέσων καλλιέργειας-Χενο, θρεπτικό υλικό καλλιέργειας χωρίς

αντιβιοτικά που προορίζεται για την επέκταση ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPS) σε συνθήκες που είναι εντελώς απαλλαγμένες από συστατικά που προέρχονται από ανθρώπους και ζώα «Good Manufacturing Practice» (GMP). (Aly 2020)

3.4 Προκλήσεις και ηθικά εμπόδια θεραπειών που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα (πινακας 3)

Οι θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα αντιμετωπίζουν πολλά εμπόδια. Ένα από αυτά αποτελεί η ηθική σύγκρουση σχετικά με τη χρήση των ESCs. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ESCs είναι πολύ ανώτερα όσον αφορά την ισχύ τους. Βέβαια, η παραγωγή τους απαιτεί την καταστροφή των ανθρώπινων εμβρύων. Είναι αλήθεια ότι η ανακάλυψη των iPSC ξεπέρασε αυτήν την ανησυχία, ωστόσο, τα εν λόγω κύτταρα αντιμετωπίζουν επί του παρόντος μια άλλη δική τους ηθική αντιπαράθεση ως προς την απεριόριστη ικανότητα διαφοροποίησής τους με ανησυχίες ότι αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν κάποια μέρα να εφαρμοστούν στην ανθρώπινη κλωνοποίηση. (Aly 2020) Η χρήση των iPSCs στη θεραπεία εξακολουθεί να θεωρείται μια μέθοδος θεραπείας υψηλού κινδύνου, καθώς η μεταμόσχευση αυτών των κυττάρων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ογκογένεση, γεγονός που αντιμετωπίζεται επί του παρόντος μέσω της ανάπτυξης βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων για τη διασφάλιση της ασφάλειάς τους (Aly 2020). Όσον αφορά τα Mesenchymal stem cells (MSC), αυτά τα κύτταρα έχουν θεωρηθεί παγκοσμίως ασφαλή, ωστόσο η συνεχής και παρατεταμένη παρακολούθηση θα πρέπει να είναι το επίκεντρο της μελλοντικής έρευνας για να αποφευχθεί η πιθανότητα σχηματισμού όγκου μετά από θεραπείες (Liu et al. 2017) Τέλος, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ένα από τα πιο προκλητικά ηθικά ζητήματα που αντιμετωπίζει ο τομέας των θεραπειών που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα αυτή τη στιγμή, είναι ο αυξανόμενος αριθμός κλινικών που προσφέρουν μη αποδεδειγμένες θεραπείες με βάση τα βλαστοκύτταρα. Οι ερευνητές είναι επομένως ηθικά υποχρεωμένοι να διασφαλίσουν ότι δεν υπονομεύονται οι ηθικοί προβληματισμοί στην επιδίωξη της προόδου στην κλινική μετάφραση.



Πίνακας 3 : Ηθικά ζητήματα των θεραπειών με βλαστικά κύτταρα.

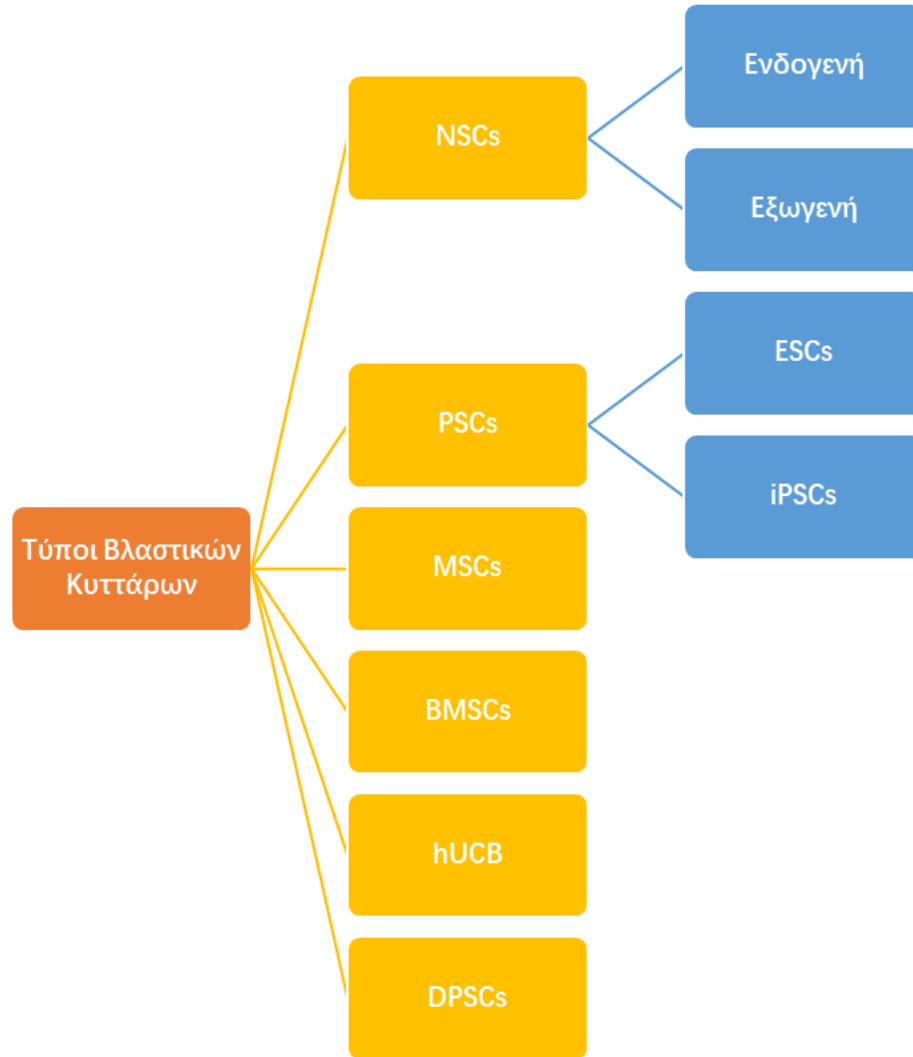
4. Ειδικό μέρος:

Στα τέλη της δεκαετίας του '90, η ικανότητα απομόνωσης και καλλιέργειας ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (ESCs) (Palma-Tortosa et al. 2021), έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας πιο εύκολα και ισχυρά ειδικών νευρωνικών υποτύπων για την αναγεννητική ιατρική, αποφεύγοντας πολλά προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση ανθρώπινου εμβρυϊκού ιστού. Μια δεκαετία αργότερα, όπως έχει προαναφερθεί χάρη στην έλευση της τεχνολογίας επαναπρογραμματισμού κυττάρων, τα ανθρώπινα ενήλικα σωματικά κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε επαγόμενα PSCs (iPSCs) (K. Takahashi and Yamanaka 2013), επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία ειδικών νευρώνων για τον ασθενή. Η χρήση ανθρώπινων iPSCs για κυτταρική θεραπεία αποφεύγει την ανάγκη για μακροχρόνιες ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, τον κίνδυνο απόρριψης μοσχεύματος και τις ηθικές ανησυχίες που σχετίζονται με τη χρήση ανθρώπινων εμβρύων. Αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρακινούν τη χρήση της στρατηγικής κυτταρικής αντικατάστασης για το εγκεφαλικό επεισόδιο. Σε αντίθεση με άλλες νευρολογικές παθήσεις, το εγκεφαλικό επεισόδιο επηρεάζει διαφορετικούς τύπους νευρωνικών

κυττάρων ανάλογα με το μέγεθος και τη θέση του συμβάντος, κάτι που έχει απαιτήσει την ανάπτυξη πολύ συγκεκριμένων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης για τη δημιουργία του κατάλληλου κυτταρικού πληθυσμού για μεταμόσχευση (Alia et al. 2019). Νέα τεχνολογικά εργαλεία επέτρεψαν την επιβεβαίωση της αντικατάστασης νευρώνων μετά από μεταμόσχευση διαφορετικών ειδών νευρικών προδρόμων που προέρχονται από PSCs στον κατεστραμμένο εγκέφαλο. Αυτές οι εξελίξεις φέρνουν τη θεραπεία με βλαστοκύτταρα πιο κοντά σε μια κλινική εφαρμογή για ασθενείς με εγκεφαλικό.

Τα οφέλη των θεραπειών με βλαστοκύτταρα για το εγκεφαλικό μπορούν να οριστούν ευρέως ως νευροαναγεννητικά, περιορίζοντας ικανά την απώλεια νευρώνων λόγω εγκεφαλικού επεισοδίου ή μεσολαβώντας στην αντικατάστασή τους (Matthew R. et al 2019). Αυτές οι θεραπείες φέρουν και νευροπροστατευτικό ρόλο, που δρα στην οξεία φάση του εγκεφαλικού για τον περιορισμό της εξάπλωσης της βλάβης (Hocum Stone et al. 2016). Ενώ τα νευροαναγεννητικά και νευροπροστατευτικά αποτελέσματα δεν αλληλοαποκλείονται, οι θεραπείες συνήθως επικεντρώνονται στην αξιοποίηση ενός από αυτά τα αποτελέσματα, με τις θεραπείες που βασίζονται στη νευροαναγέννηση να κυριαρχούν στις προκλινικές και κλινικές δοκιμές (L. Chen et al. 2016). Επιπλέον, όπως έχει ήδη περιγραφεί αν και το εγκεφαλικό είναι μια ασθένεια των αγγείων, προκαλεί σημαντική ανοσολογική απόκριση. Η ανοσολογική απόκριση συνδέεται με την επούλωση, αλλά περιλαμβάνει επίσης και μια νευροφλεγμονώδη συνιστώσα που εμπλέκεται στην επιδείνωση του αρχικού τραυματισμού μέσω της καταστροφής του νευρικού ιστού (Rayasam et al. 2018). Ορισμένοι πληθυσμοί βλαστοκυττάρων έχουν επιδείξει την ικανότητα να ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και προσφέρουν την υπόσχεση νευροπροστατευτικών και νευροαναγεννητικών επιδράσεων, ενισχύοντας τελικά τα θεραπευτικά αποτελέσματα και μετριάζοντας παράλληλα τη φλεγμονώδη βλάβη (Matthew R. et al 2019)

Οι προσπάθειες για τη χρήση βλαστοκυττάρων για τη θεραπεία του εγκεφαλικού έχουν κατηγοριοποιηθεί σε γενικούς τύπους κυττάρων (Σχήμα 10), συμπεριλαμβανομένων: νευρικών βλαστοκυττάρων, βλαστοκυττάρων μυελού των οστών και μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (τα οποία επικαλύπτονται με βλαστοκύτταρα μυελού των οστών) κλπ.

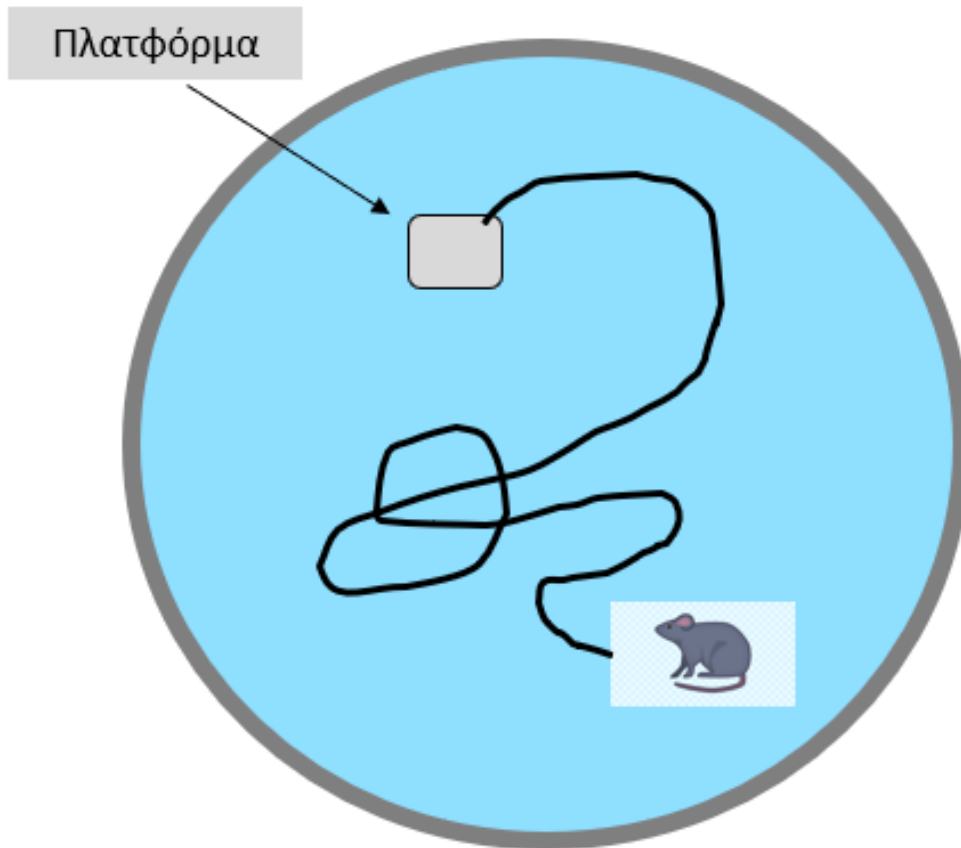


Σχήμα 10 : Κύριοι τύποι βλαστικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε θεραπείες με βλαστικά κύτταρα για το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

4.1 Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα (NSCs):

Η βάση για τις θεραπείες με νευρικά βλαστοκύτταρα βασίστηκε στην παρατήρηση ότι τα νευρικά προγονικά κύτταρα [neural progenitor cells (NPCs)] που προέρχονται από τη νευρική πλάκα πρώιμων εμβρύων ποντικού συνέβαλαν στο σχηματισμό νευρωνικών κυττάρων όταν μεταμοσχεύθηκαν σε εγκεφάλους ενηλίκου ποντικού (Uchida et al. 1995). Η δυνατότητα αυτών των NPCs να συνεισφέρουν στον σχηματισμό νευρωνικών κυττάρων ώθησε τη διερεύνηση του κατά πόσον οι μεταμοσχεύσεις νευρικών προγονικών κυττάρων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για

τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλικού επεισοδίου (Fukunaga et al. 1999). Σε μοντέλα αρουραίων ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, οι μεταμοσχεύσεις NPCs βελτίωσαν την απόδοση του υδάτινου λαβύρινθου Morris (Εικόνα 5) και ενίσχυσαν την αγγειογένεση στο σημείο της μεταμόσχευσης, υποδηλώνοντας ότι οι μεταμοσχεύσεις NPCs βελτίωσαν τη γνωστική λειτουργία και την ανάκαμψη μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο (Fukunaga et al. 1999)



Εικόνα 5: Ο υδάτινος λαβύρινθος Morris είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες απλές δοκιμασίες στις νευροεπιστήμες για τη μελέτη των ψυχολογικών διεργασιών και των νευρικών μηχανισμών της χωρικής μάθησης και μνήμης. Πειραματόζωα, συνήθως αρουραίοι ή ποντίκια, τοποθετούνται σε μια μεγάλη κυκλική δεξαμενή νερού και καλούνται να διαφύγουν από το νερό σε μια κρυφή πλατφόρμα της οποίας η τοποθεσία μπορεί κανονικά να εντοπιστεί μόνο χρησιμοποιώντας χωρική μνήμη. Δεν υπάρχουν τοπικές ενδείξεις που να δείχνουν πού βρίσκεται η πλατφόρμα. Εννοιολογικά, η εργασία προέρχεται από κύτταρα θέσης που είναι νευρώνες στον ιππόκαμπο που αναγνωρίζουν ή αντιπροσωπεύουν σημεία στο χώρο σε ένα περιβάλλον.

4.1.1 Ενδογενή NSCs

Τα NSCs ενηλίκων εντοπίζονται κυρίως στην οδοντωτή έλικα του υπόκαμπου, στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) και στον οσφρητικό βολβό (Ming and Song 2011). Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει αυξημένο πολλαπλασιασμό των NSCs εντός της subventricular zone (SVZ) σε ζωικό μοντέλο MCAO, ο οποίος πιθανά πυροδοτήθηκε από κυτοκίνες και χημειοκίνες όπως Vascular endothelial growth factor (VEGF), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) παραμένοντας τελικά για τουλάχιστον τέσσερις μήνες μετά την ισχαιμία (Thored et al. 2006). Διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης εμπλέκονται επίσης στη νευρογένεση που προκαλείται από εγκεφαλικό, συμπεριλαμβανομένου του Notch, του ρετινοειδούς, των Bone Morphogenetic Proteins (BMPs,) του TNF- α και του sonic hedgehog, ένα κλειδί στη ρύθμιση της εμβρυϊκής μορφογένεσης (Hao et al. 2014a). Τα ενδογενή NSCs έχουν εστιακή λειτουργία, παράγοντας νευροτροφικούς παράγοντες όπως ο Nerve growth factor (NGF) και ο Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) και προάγουν τη ρύθμιση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος, την παραγωγή προαγγειογενετικών συμπλεγμάτων συμπεριλαμβανομένων της νετρίνης-4, της λαμινίνης και των ιντεγκρινών και εκκρίνουν παράγοντες που προάγουν τη νευροπλαστικότητα όπως οι θρομβοσπονδίνες (Hao et al. 2014a).

Ωστόσο, ο αριθμός και το ποσοστό επιβίωσης των νευρώνων από αυτά τα NSCs ήταν εξαιρετικά χαμηλός, πιθανώς λόγω της αλλαγής του περιβάλλοντος με υψηλή συγκέντρωση φλεγμονωδών κυτοκινών. Ορισμένες προσεγγίσεις που στοχεύουν στην προώθηση της ενδογενούς νευρογένεσης μέσω της ενίσχυσης του ενδογενούς πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης του NSCs έχουν προσφέρει έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο για τη θεραπεία του εγκεφαλικού. Για παράδειγμα, η αυξημένη συγκέντρωση ορισμένων κυτοκινών όπως ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF) και ο VEGF στην τοπική περιοχή με γονιδιακή τροποποίηση ή άμεση έγχυση προάγει δραστικά τη μετανάστευση των ενδογενών Neural stem/progenitor cells NSPCs σε τραυματισμένες περιοχές του εγκεφάλου (Hao et al. 2014a). Η ερυθροποιητίνη (EPO) μπορεί να ενισχύσει τη νευρογένεση και την

αγγειογένεση μέσω BDNF και VEGF σε μοντέλο εγκεφαλικού επεισοδίου επίμυος (Wang et al. 2004). Η 1-φωσφορική σφινγγοσίνη (S1P) αύξησε σημαντικά τη μετανάστευση των ενδογενών NPCs προς το τραυματισμένο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο ανταγωνιστής Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 (S1P2R) ρυθμίζει προς τα πάνω τις αποκρίσεις μετανάστευσης που προκαλούνται από το S1P και αυξάνει την ενδογενή μετανάστευση NPCs προς την ισχαιμική προσβολή (Kimura et al. 2008). Ωστόσο, σε μια μεγάλη κλινική δοκιμή, το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ασθενών με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο που έλαβαν θεραπεία με EPO ήταν σημαντικά υψηλότερο από τους μάρτυρες (Ehrenreich et al. 2009). Απαιτούνται περισσότερες και αυστηρές προκλινικές μελέτες για την ασφάλεια των βιολογικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για την προώθηση της ενδονευρογένεσης.

4.1.2 Εξωγενή NSCs

Τα εξωγενή NSCs θα μπορούσαν να ληφθούν από μια πλειάδα πηγών όπως: ESCs, iPSCs, MSCs από μυελό των οστών, εμβρυϊκά NSCs και εμβρυϊκά και ενήλικα νευρικά συστήματα (Garzón-Muvdi and Quiñones-Hinojosa 2010) Ο πολλαπλασιασμός *in vitro* όταν διεγείρονται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF) και ο παράγοντας αναστολής της λευκαϊμίας (LIF) και η διαφοροποίηση σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα όταν επάγονται από διαφορετικούς παράγοντες όπως το ρετινοϊκό οξύ είναι χαρακτηριστικά που τα καθιστούν υποσχόμενους υποψηφίους για την αντικατάσταση των χαμένων νευρικών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλικού. Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά NSCs είναι λιγότερο ογκογονικά από τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Επιπλέον, τα NSCs εκφράζουν καθόλου ή χαμηλά επίπεδα μορίων MHC, τα οποία εξαλείφουν το πρόβλημα της ανοσοαπόρριψης (Hori et al. 2003). Ωστόσο, υπήρξαν επίσης πειράματα που έδειξαν ότι η έκφραση των μορίων MHC στα NSCs αυξήθηκε υπό φλεγμονώδεις συνθήκες (Yin et al. 2008). Το μειονέκτημα των NSCs περιλαμβάνει περιορισμένη ικανότητα επέκτασης και διαφοροποίησης όταν καλλιεργούνται *in vitro*.

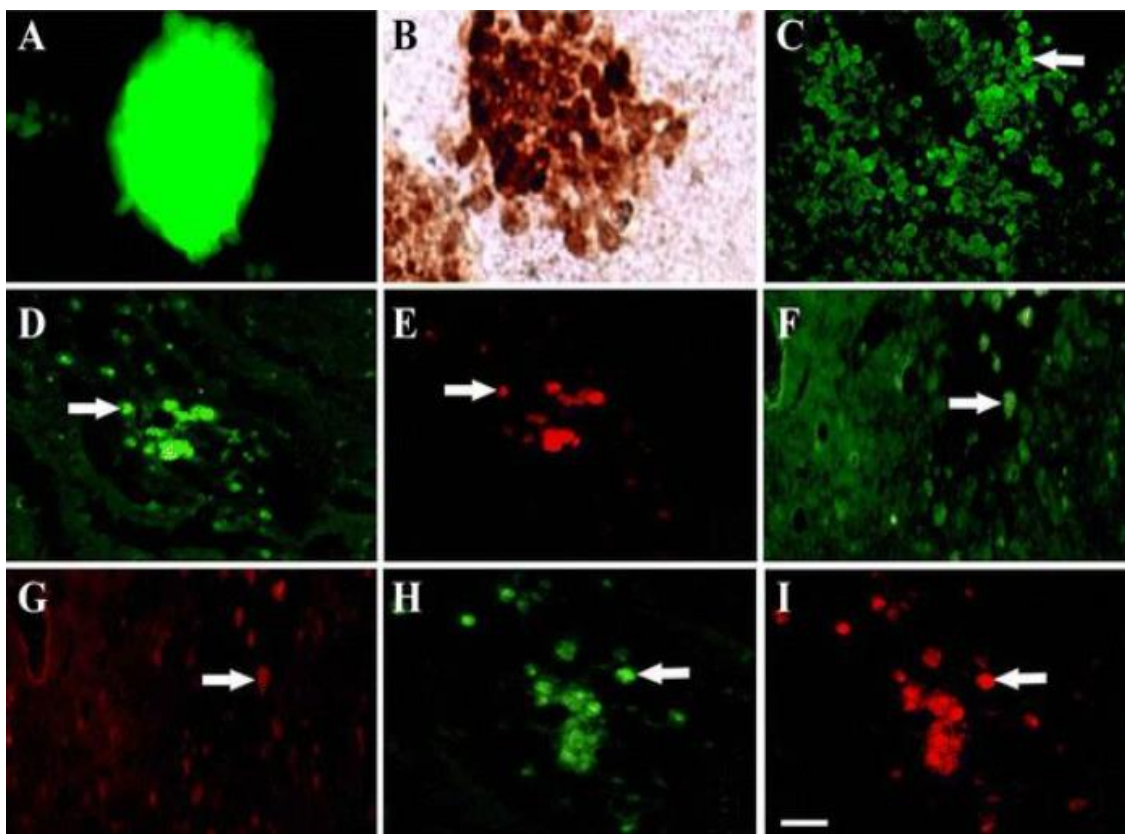
Με βάση την προκλινική επιτυχία των μοσχευμάτων hNPC για τη θεραπεία του εγκεφαλικού επεισοδίου, δημιουργήθηκε μια σταθερή κυτταρική σειρά υπό συνθήκες

GMP (Good Manufacturing Practice) και παράγαγε την απαθανατισμένη σειρά hNPC CTX0E03 (Pollock et al. 2006). Σε μοντέλα ποντικών, το CTX0E03 έδειξε την ικανότητα να επιβιώνει από τη μεταμόσχευση στον εγκέφαλο ισχαιμικών αρουραίων και να προκαλεί αγγειογένεση, νευρογένεση, βελτίωση της συμπεριφοράς και μείωση του όγκου του εμφράγματος (Smith et al. 2012). Μετά την επιτυχία της σε μοντέλα ισχαιμικών αρουραίων, η σειρά CTX0E03 προχώρησε σε κλινικές δοκιμές. Το PISCES (**Pilot Investigation of Stem Cells in Stroke**) I (φάση 1) κατέδειξε για πρώτη φορά την ασφάλεια του CTX0E03 DP (το φαρμακευτικό προϊόν CTX0303) σε ανθρώπους, όπου η ενδοεγκεφαλική μεταμόσχευση έως και 20 εκατομμυρίων κυττάρων ήταν ανεκτή, χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις. Επιπλέον, μετά τη μεταμόσχευση, οι ασθενείς εμφάνισαν βελτιώσεις στις βαθμολογίες εγκεφαλικού επεισοδίου NIH, Ashworth scale και Barthel index, υποδηλώνοντας ότι οι μεταμοσχευόμενοι CTX0303 DP βελτίωσαν τη λειτουργική νευρολογική αποκατάσταση (Kalladka et al. 2016). Το PISCES II (φάση 2) έχει έκτοτε ολοκληρωθεί και το PISCES III (φάση 3) βρίσκεται τώρα σε εξέλιξη για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του CTX0E03 DP.

Πρόσφατα, οι Tornero et al. έδειξαν ότι οι νευρώνες που προέρχονται από μοσχεύματα induced neuronal progenitor cells (hiNPCs) έλαβαν άμεσες συναπτικές συνδέσεις από νευρώνες-ξενιστές σε μοτίβα παρόμοια με τους αντίστοιχους ενδογενείς νευρώνες στον άθικτο εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι τα hiNPCs συμβάλλουν στη λειτουργική ανάκαμψη από το εγκεφαλικό, μέσω της άμεσης συμβολής νέων νευρώνων (Tornero et al. 2017). Η χρήση των hiNPCs σε προκλινικές θεραπείες μοντέλων εγκεφαλικού ποντικού παρέχει υποστήριξη για την χρήση NPCs για τη θεραπεία του εγκεφαλικού στην κλινική πρακτική.

Μεγάλος αριθμός πειραμάτων επιβεβαίωσαν ότι η μεταμόσχευση NSCs προερχόμενων από διάφορες πηγές και χορηγούμενων από διαφορετικές οδούς μείωσε την περιοχή του εφράκτου και ενίσχυσε την αποκατάσταση της νευρολογικής λειτουργίας σε ζωικά μοντέλα με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, αν και υπάρχουν μεμονωμένες εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα, η ενδοεγκεφαλική έγχυση NSCs που προέρχονται από ανθρώπινα iPSCs στο μοντέλο ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου, παρόλο που τα NSCs μπορούσαν να επιβιώσουν και να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες (Hao et al. 2014a). Ο χρόνος, η δόση και ο τύπος του μεταμοσχευμένου

κυττάρου μπορεί να ευθύνονται για τα διαφορετικά αποτελέσματα. Τα NSCs σε συνδυασμό με γονιδιακή τροποποίηση θα μπορούσαν να ενισχύσουν την επιβίωσή τους, τον πολλαπλασιασμό και τις ικανότητες μετανάστευσης και να εκκρίνουν νευροτροφικούς παράγοντες ως φορείς γονιδιακής θεραπείας. (Hao et al. 2014a)



Εικόνα 6: Επιβίωση και διαφοροποίηση των μεταμοσχευμένων NSCs στον εγκέφαλο του ζενιστή. Οι νευροσφαίρες εμφανίζουν πράσινο φθορισμό (α) και εκφράζουν νεστίνη (β). Μετά τη μεταμόσχευση, τα NSCs θα μπορούσαν να επιβιώσουν και να μεταναστεύσουν στον εγκέφαλο γύρω από την τραυματισμένη περιοχή. Τα NSCs GFP+ στα d και f είναι επίσης θετικά για β-τουμπουλίνη III (e) και GFAP (g), αντίστοιχα, υποδηλώνοντας τη διαφοροποίησή τους τόσο προς τους νευρώνες όσο και προς νευρογλοιακά κύτταρα. Είναι σημαντικό ότι τα μεταμοσχευμένα GFP-NSCs (h) εξέφρασαν BDNF (i) στον εγκέφαλο ζενιστή γύρω από την περιοχή τραυματισμού. Τα λευκά βέλη έδειχναν τη θετική χρώση (Xiong et al. 2018)

Οδός μεταμόσχευσης:

Τα βλαστοκύτταρα που κυκλοφορούν μπορούν να μεταναστεύσουν μέσω της κύλισης και της προσκόλλησης στο ενδοθήλιο στην περιοχή του εμφράκτου πιθανότατα ως απόκριση σε χημειοτακτικά ερεθίσματα. Η πρωτεΐνη Vascular cell adhesion protein- 1 (VCAM-1) και οι ιντεγκρίνες α_2 , α_6 και β_1 μπορεί να εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ βλαστοκυττάρων και ενδοθηλίου. Στη συνέχεια, τα NSCs οδηγούνται σε στοχευμένη περιοχή του εγκεφάλου μέσω χημειοκινών όπως SDF-1, MCP-1 Ang-1 και Slit (Hao et al. 2014a). Η πλεονεκτική επίδραση της ενδοεγκεφαλικής μεταμόσχευσης NSCs στο εγκεφαλικό επεισόδιο εξαρτάται από τον υψηλό ενδοεγκεφαλικό αριθμό μοσχευμένων κυττάρων. Ωστόσο, η συστηματική χορήγηση NSCs προωθεί τη νευροπροστασία παρά τον χαμηλό ενδοεγκεφαλικό αριθμό μοσχευμένων κυττάρων μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως η σταθεροποίηση του ΑΕΦ και η μείωση των ROS κατά την πρόιμη επαναιμάτωση (Doerrner et al. 2012). Έτσι, η ενδοαγγειακή χορήγηση των NSC επιτυγχάνει καλύτερη κατανομή στις τραυματισμένες περιοχές του εγκεφάλου και αποφεύγει τη διαδικασία της επεμβατικής χειρουργικής.

Χρόνος και δόση μεταμόσχευσης κυττάρων

Σε μια μελέτη μοντέλου MCAO επίμυος(Darsalia et al. 2011), η εστιακή μεταμόσχευση ανθρώπινων NSCs νωρίς μετά το εγκεφαλικό επεισόδιο (48 ώρες) είχε ως αποτέλεσμα καλύτερη κυτταρική επιβίωση από τη μεταμόσχευση 6 εβδομάδες μετά το εγκεφαλικό, αλλά η καθυστερημένη μεταμόσχευση δεν επηρέασε το μέγεθος μετανάστευσης, την νευρωνική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα μοσχεύματα. Η μεταμόσχευση μεγαλύτερου αριθμού NSCs δεν είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη επιβίωση ή διαφοροποίηση. Ο βέλτιστος χρόνος και η δόση της μεταμόσχευσης κυττάρων αλλάζουν ανάλογα με το ζωικό μοντέλο, την κυτταρική πηγή και την οδό έγχυσης. Συμπερασματικά, η μεταμόσχευση πριν από τη μέγιστη ενεργοποίηση της μικρογλοίας ήταν πιο ευεργετική για την επιβίωση των κυττάρων. (Hao et al. 2014a)

Μηχανισμοί:

Οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η βελτιωμένη λειτουργική ανάκαμψη παραμένουν ασαφείς. Η αντικατάσταση κυττάρων αναγνωρίστηκε αρχικά ως ο κύριος μηχανισμός πλεονεκτικής επίδρασης των μεταμοσχευμένων NSCs. Στις περισσότερες μελέτες σε ζώα, τα NSCs βρέθηκαν να διαφοροποιούνται σε νευρωνικούς και/ή νευρογλοιακούς φαινότυπους (Hao et al. 2014b). Η συναπτογένεση και η λειτουργική ηλεκτροφυσιολογική ενσωμάτωση των εξωγενών NSCs στο νευρωνικό κύκλωμα του εγκεφάλου του ξενιστή έχει επίσης αποδειχθεί (Englund et al. 2002). Ωστόσο, βελτιωμένη λειτουργική ανάκτηση θα μπορούσε να παρατηρηθεί πριν ακόμα επιτευχθεί νευρωνική διαφοροποίηση, υποδηλώνοντας ότι η κυτταρική αντικατάσταση μπορεί να μην είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επίδραση των βλαστοκυττάρων στην ανάκτηση των νευρώνων.

Νευροπροστατευτικές Επιδράσεις.

Τα ολιγάριθμα NSCs που επιβίωσαν στην περιοχή της βλάβης δεν θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τους χαμένους νευρώνες. Ως εκ τούτου, υποτίθεται ότι οι νευροπροστατευτικές κυτοκίνες που εκκρίνονται από εξωγενή NSCs, βλαστοκύτταρα ξενιστή και/ή άλλα κύτταρα, όπως VEGF, BDNF, NGF και νευροτροφίνες, μπορεί να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργική αποκατάσταση μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο άμεσα ή έμμεσα μέσω αγγειογένεσης, ανοσορύθμισης, ενδογενούς νευρογένεσης και ούτω καθεξής (Hao et al. 2014a). Η αυξημένη δένδριτική πλαστικότητα στο εγκεφαλικό επεισόδιο έχει συνδεθεί με παρακρινικές επιδράσεις των NSCs πιθανώς μέσω του VEGF και των θρομβοσποντινών 1 και 2 (Andres et al. 2011).

Διαμόρφωση Φλεγμονώδους και Ανοσολογικής Απόκρισης:

Η μικρογλοία είναι ο κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής. Φάνηκε ότι η ενδοφλέβια χορήγηση NSCs μείωσε τη μικρογλοία OX-42+ (OX-42 ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει τους υποδοχείς συμπληρώματος τύπου 3 CR3 σε μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα) και τη διήθηση ουδετερόφιλων MPO+ [(MPO) Myeloperoxidase εκφράζεται περισσότερο σε κοκκιοκύτταρα ουδετερόφιλων] στην εγκεφαλική βλάβη και επίσης εξασθένησε τόσο τις εγκεφαλικές όσο και τις σπληνικές ενεργοποιήσεις των TNF-a, IL-6 και NF-kB, που προάγουν τη νευροπροστασία στο μοντέλο εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου (S. T. Lee

et al. 2008) Ορισμένοι ρυθμιστές φλεγμονής, όπως οι υποδοχείς TNF- α , IL-1 β , IL-6 και λεπτίνης, έχουν επίσης μειωθεί στον εγκέφαλο ισχαιμίας μετά τη μεταμόσχευση NPCs (Bacigaluppi et al. 2009)

4.2 Εμβρυικά βλαστικά Κύτταρα (ESCs):

Το πλεονέκτημα των ESCs βασίζεται στην ικανότητά τους για απεριόριστη επέκταση *in vitro* καλύπτοντας έτσι την απαιτούμενη ποσότητα κυττάρων. Μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν σε νευρική γενεαλογία υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* (Hao et al. 2014a). Ως εκ τούτου, τα ESCs έχουν θεωρηθεί ως ιδανική πηγή μεταμοσχευμένων κυττάρων για τη θεραπεία νευρικών διαταραχών. Μετά τη μεταμόσχευση ESCs ποντικού σε φλοιό αρουραίου με σοβαρή εστιακή ισχαιμία, κύτταρα προερχόμενα από ESCs που εκφράζουν δείκτες κυτταρικής επιφάνειας νευρώνων, αστροκυττάρων, ολιγοδενδροκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων μπορούν να βρεθούν στην κοιλότητα της βλάβης και έχει αποδειχθεί βελτιωμένη δομική επισκευή και λειτουργική αποκατάσταση (Wei et al. 2005) Η μεταμόσχευση ESCs ή νευρικών κυττάρων που προέρχονται από ESCs, στο ραβδωτό σώμα ποντικού βελτίωσε τη ντοπαμινεργική λειτουργία και στη συνέχεια ανέκτησε τη συμπεριφορική δυσλειτουργία σε αρουραίους που υποβλήθηκαν σε απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (MCAO) (Yanagisawa et al. 2006). Η ηθική ανησυχία, οι περιορισμένες πηγές και η σχετική υψηλή συχνότητα κακοήθους μετασχηματισμού περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή των ESCs.

Η μεταμόσχευση διαφοροποιημένων κυττάρων που προέρχονται από ESCs παρέχει έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο αποφυγής κακοήθους μετασχηματισμού των ESCs όταν εγχέονται *in vivo*. Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση των NSPCs που προέρχονται από ESCs σε ζωικά μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου όπου τα περισσότερα αποτελέσματα έδειξαν βελτίωση του ελλείμματος συμπεριφοράς, μειωμένη περιοχή εμφράκτου και αυξημένη διαφοροποίηση σε νευρώνες μετά τη μεταμόσχευση κυττάρων, παρά τις διαφορετικές πηγές κυττάρων, τα διαφορετικά μοντέλα ζώων και τις διαφορετικές οδούς έγχυσης.(Hao et al. 2014a)Ο κακοήθης μετασχηματισμός των νευρικών κυττάρων που προέρχονται από ESCs έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με το

μεταισχαιμικό περιβάλλον πιθανώς με τη διέγερση διαφόρων τοπικών κυτοκινών (Hao et al. 2014a)

Η ενδοαρτηριακή μεταμόσχευση ανθρώπινων ενδοθηλιακών και τοιχωματικών κυττάρων που προέρχονται από ESCs αύξησε σημαντικά την αγγειακή πυκνότητα στο ραβδωτό σώμα που ισχαιμεί, μειώνοντας τον όγκο του εμφράκτου και της απόπτωσης επιταχύνοντας τελικά την νευρολογικής ανάκαμψη σε ποντίκια με παροδικό MCAO.(Oyamada et al. 2008) Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η υψηλότερη πυκνότητα των εγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων μειώνει τον κίνδυνο μετέπειτα εμφάνισης ασθενών που πάσχουν από εγκεφαλικό επεισόδιο. Οποιοδήποτε θεραπευτικό μέτρο που στοχεύει στην προώθηση της αγγειογένεσης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αποκατάσταση της λειτουργίας ασθενών με εγκεφαλικό επεισόδιο.

4.3 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs)

Τα iPSCs παρουσιάζουν ανάλογη μορφολογία και ιδιότητες ανάπτυξης με τα ESCs και εκφράζουν γονίδια δεικτών ESCs. Η in vivo υποδόρια μεταμόσχευση iPSCs σε ποντίκια οδηγεί σε ανάπτυξη όγκων που περιέχουν ιστούς και από τα τρία βλαστικά στρώματα. Αργότερα, τα iPSCs έχουν επίσης δημιουργηθεί από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων του ομφάλιου λώρου, των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων του πλακούντα, των νευρικών βλαστοκυττάρων και των πρόδρομων κυττάρων που προέρχονται από το λίπος χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική (Tat et al. 2010). Τα θεραπευτικά αποτελέσματα της υποσκληρίδιας μεταμόσχευσης iPSCs αναμειγμένων με κόλλα ινώδους σε αρουραίους MCAO έδειξαν πως μειώθηκε αποτελεσματικά ο συνολικός όγκος εμφράκτου και βελτιώθηκε σημαντικά η συμπεριφορά των αρουραίων με MCAO για την εκτέλεση εργασιών περιστροφής και σύλληψης.(S. J. Chen et al. 2010)

Η εξασθένηση της φλεγμονής στον ισχαιμικό εγκέφαλο μπορεί να εμπλέκεται στην ευεργετική και προστατευτική δράση των iPSCs. Σε μια άλλη μελέτη, τα μεταμοσχευμένα iPSCs από ενήλικους ανθρώπινους ινοβλάστες σε μοντέλο MCAO αρουραίου μπορούν να μεταναστεύσουν στην τραυματισμένη περιοχή του εγκεφάλου βελτιώνοντας σημαντικά την αισθητικοκινητική λειτουργία(Jiang et al. 2011). Ωστόσο,

σε μια μελέτη, με μετά από μεταμόσχευση iPSCs ένα μέρος τους διαφοροποιήθηκε σε νευροβλάστες και νευρώνες, υποδεικνύοντας μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την παροχή επαρκών νευρωνικών κυττάρων για το ΙΑΕΕ. Τα iPSCs έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζουν τεράτωμα μετά τη μεταμόσχευση στον ισχαιμικό εγκέφαλο ποντικών (Kawai et al. 2010). Μια ανησυχία σχετικά με την εφαρμογή iPSCs είναι η κυτταρική ανοσογονικότητα. (Kawai et al. 2010) Διαπιστώθηκε ότι τα τερατώματα που σχηματίστηκαν από iPSCs προερχόμενα από εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού B6 απορρίφθηκαν ανοσολογικά ως επί το πλείστον από τους λήπτες B6(Zhao et al. 2011). Συνεπώς, τα iPSCs, ακόμη και αυτόλογα, μπορεί να προκαλέσουν ανοσοαπόρριψη.

Η ανάδειξη της νευρωνικής αντικατάστασης θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει στοιχεία για τη δημιουργία λειτουργικών απαγωγών συνδέσεων από τα μοσχευμένα κύτταρα στους νευρώνες των κατάλληλων δομών του εγκεφάλου του ξενιστή. Από αυτή την άποψη, η μονοσυναπτική ιχνηλάτηση του ιού της λύσσας έχει δείξει ότι οι πρόγονοι που προέρχονται από iPSCs που μεταμοσχεύθηκαν στον κατεστραμμένο σωματοαισθητικό φλοιό σχημάτισαν λειτουργικές απαγωγές συναπτικές συνδέσεις με νευρώνες-ξενιστές που βρίσκονται στον ετερόπλευρο σωματοαισθητικό φλοιό (Palma-Tortosa et al. 2020). Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι οι νευράξονες που προέρχονται από μόσχευμα εμφάνισαν υπερδομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των αξόνων του ξενιστή καθώς και διαφορετικούς βαθμούς μυελίνωσης από τα ολιγοδενδροκύτταρα του ξενιστή.

4.4 Μεσεγγυματικά Βλαστικά Κύτταρα (MSCs):

Τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) διερευνήθηκαν για θεραπευτική εφαρμογή στο εγκεφαλικό επεισόδιο λόγω της δυνατότητας πολλαπλής διαφοροποίησής τους και της ικανότητάς τους να επάγουν ανοσοτροποποιητικές και τροφικές επιδράσεις. Μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι τα MSCs που εγχύθηκαν στην περιφέρεια μετανάστευσαν κατά προτίμηση προς περιοχές με βλάβη το οποίο σε μοντέλα ισχαιμικού τραυματισμού συσχετίστηκε με βελτιωμένη ανάκαμψη(Y. Li et al. 2001). Σε μελέτες μοντέλων εγκεφαλικού επεισοδίου ποντικού, οι θεραπείες με MSCs έδειξαν την ικανότητα να αυξάνουν την αξονική πυκνότητα γύρω από την ισχαιμική βλάβη, συμβάλλοντας στην

αναδιαμόρφωση των νευραξόνων και συσχετίζονται με βελτιωμένη λειτουργική αποκατάσταση (Yi Li et al. 2005)

Τα MSCs ενώ βρέθηκαν για πρώτη φορά στον μυελό των οστών έχουν πλέον αναγνωριστεί από πολλές διαφορετικές πηγές ιστού, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού και του αίματος του ομφάλιου λώρου. Η ταξινόμηση των MSCs παραμένει πρόκληση λόγω της ετερογενούς φύσης και της διακύμανσής τους που αποδίδεται στη μέθοδο απομόνωσης και την τεχνική καλλιέργειας της πηγής ιστού (όταν επεκτείνεται *ex vivo*) (Matthew R. et al 2019) Μέχρι σήμερα έχουν ολοκληρωθεί πολλαπλές δοκιμές φάσης III με χρήση MSCs για διάφορες ασθένειες, αν και όχι για εγκεφαλικό, και έχουν επιδείξει ένα ισχυρό προφίλ ασφάλειας με παροδικές εμπύρετες αντιδράσεις ως το μόνο συμβάν που σχετίζεται με την έγχυση MSCs (Lalu et al. 2012) Μελέτες Φάσης I για τη θεραπεία του εγκεφαλικού επεισοδίου έχουν παρομοίως αποδείξει την ασφάλεια του *ex vivo* διευρυμένου MSC όταν χορηγείται IV (Honmou et al. 2011). Σε μια άλλη δοκιμή Φάσης II η θεραπεία με MSCs αποδείχθηκε ότι είναι καλά ανεκτή και σχετίζεται με βραχυπρόθεσμη μείωση των κυκλοφορούντων T-κυττάρων και των φλεγμονωδών κυτοκινών. Ωστόσο, δεν σημειώθηκαν βελτιώσεις στα νευρολογικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την ομάδα placebo (Hess et al. 2017).

Η ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης σε νευρικά κύτταρα *in vitro*, όπως αποδεικνύεται από την έκφραση νευρωνικών δεικτών όπως το NeuN, η μετανάστευση προς πηγές βλαβών στον εγκέφαλο και ανησυχίες που δεν σχετίζονται με ηθική και απόρριψη ιστού καθιστούν τα MSCs μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στη θεραπεία εγκεφαλικού..

Οδός Μεταμόσχευσης

Τα ενδοφλέβια ή ενδοεγκεφαλικά μεταμοσχευμένα MSCs θα μπορούσαν να μεταναστεύσουν στον τραυματισμένο εγκέφαλο και να προάγουν τη λειτουργική βελτίωση σε πειραματικά ζωικά μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε μειωμένος όγκος εμφράγματος. Η ικανότητα μετανάστευσης των MSCs μπορεί να διαμεσολαβείται από αυξημένες χημειοκίνες όπως Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) στο περιβάλλον και τον C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) που εκφράζεται στα MSCs. Υπάρχουν επίσης πολλοί άλλοι

πιθανοί παράγοντες, όπως IL-8, MCP-1, MIP-1a και VEGF, που μπορεί να εμπλέκονται στη μετανάστευση των MSCs στον τραυματισμένο εγκέφαλο (Hao et al. 2014a). Η ενδοφλέβια χορήγηση MSCs είναι καταλληλότερη από την ενδοεγκεφαλική ένεση επειδή είναι λιγότερο επεμβατική, πιο νευροπροστατευτική και εύχρηστη.

Χρόνος και Δόση Μεταμόσχευσης Κυττάρων:

Η βέλτιστη δόση κυτταρικής θεραπείας παραμένει επί του παρόντος ασαφής. Η δόση των 1-2 εκατομμυρίων κυττάρων/kg σωματικού βάρους προτάθηκε για κλινική μελέτη (Bhasin et al. 2013). Ο βέλτιστος χρόνος μεταμόσχευσης εξαρτάται από το δυναμικά μεταβαλλόμενο περιβάλλον στον τραυματισμένο εγκέφαλο. Η πρόιμη μεταμόσχευση των MSCs πιθανότατα παίζει νευροπροστατευτικό ρόλο λόγω της εξουδετέρωσης της τοξικότητας και της φλεγμονώδους απόκρισης. Η μεταμόσχευση στις 2-3 εβδομάδες μετά την ισχαιμία είναι πιθανώς ανώτερη στην ενίσχυση της ενδογενούς νευρωνικής επιδιόρθωσης, όπως η πλαστικότητα, η αγγειογένεση και η νευρογένεση, που είναι πιο έντονες εκείνη τη στιγμή. Ενισχυμένη λειτουργική αποκατάσταση παρατηρήθηκε ακόμη και 1 χρόνο μετά τη χορήγηση σε ισχαιμικούς αρουραίους (Shen et al. 2007).

Μηχανισμοί:

Τα MSCs έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε κύτταρα νευρικής καταγωγής *in vitro* και να εκφράζουν νευρωνικούς ή νευρογλοιακούς δείκτες σε ισχαιμικό εγκέφαλο ζωικών μοντέλων (Hao et al. 2014a). Όμως, η κυτταρική αντικατάσταση μπορεί να μην είναι κυρίως υπεύθυνη για την ευεργετική επίδραση των MSCs στην ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη *in vivo*. Τα MSCs μπορεί να ασκούν τα αποτελέσματά τους μέσω μιας σειράς εκκρινόμενων τροφικών παραγόντων που άμεσα ή έμμεσα προάγουν την ισχαιμική αποκατάσταση του εγκεφαλικού ιστού. Τα MSCs διεγείρονται να εκκρίνουν διάφορους νευροτροφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών, των χημειοκινών και της πρωτεΐνης εξωκυτταρικής μήτρας από κατεστραμμένο περιβάλλον.

Νευροπροστατευτικά αποτελέσματα :

Αρκετές μελέτες διαπίστωσαν ότι πολυάριθμοι νευροτροφικοί παράγοντες όπως SDF-1, VEGF, GDNF, BDNF, NGF, IGF, EGF και bFGF αυξήθηκαν σημαντικά στον ισχαιμικό εγκέφαλο ζώων μετά από θεραπεία με MSCs (Ding et al. 2007) Αυτοί οι αυξημένοι νευροτροφικοί παράγοντες εκκρίθηκαν από τα MSCs άμεσα και/ή διεγέρθηκαν έμμεσα τα κύτταρα-ξενιστές. Η νευροπροστασία με τη μεσολάβηση αυτών των νευροτροφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της αντιαπόπτωσης, της αύξησης της επιβίωσης των νευρώνων, της αντιοξειδωσης, της διεγερτικής τοξικότητας των αντιγλουταμινικών και της αντιφλεγμονώδους δραστηριότητας πιθανώς ευθύνονται για τα ευεργετικά αποτελέσματα των MSCs στην ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι, τα MSCs θα μπορούσαν να αυξήσουν την ενεργοποίηση του Tissue plasminogen activator (tPA) και να μειώσουν τα επίπεδα Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) στην ισχαιμική οριακή ζώνη, τα οποία προάγουν την παραγωγή νευραξόνων και συναπτοφυσίνης ενισχύοντας τη λειτουργική ανάκαμψη σε μοντέλο εγκεφαλικού επεισοδίου επίμυος(Xin et al. 2010).

Αγγειογένεση:

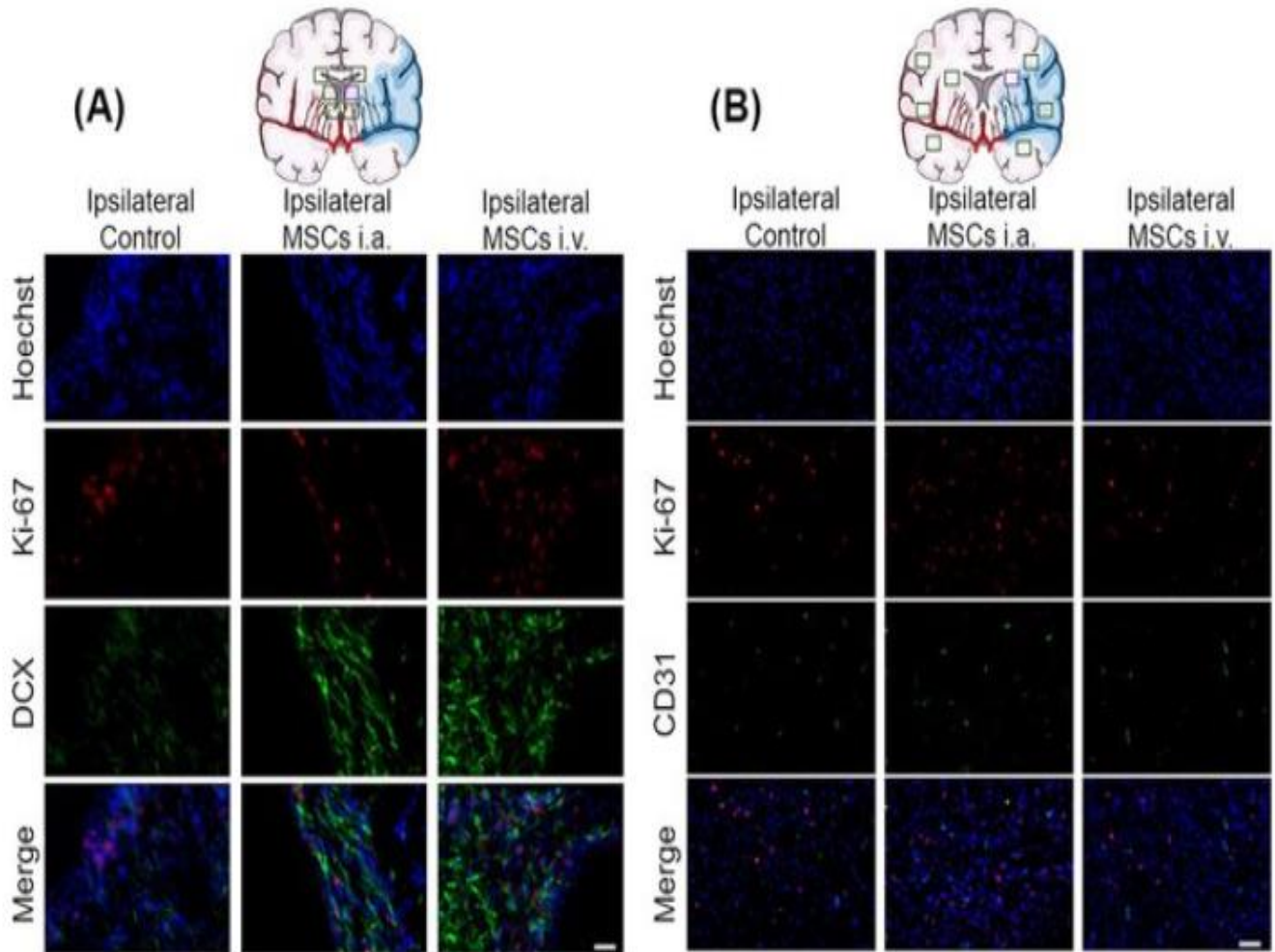
Τα MSCs έχουν επίσης περιγραφεί ότι ευνοούν την αγγειογένεση και τη συναπτογένεση. Η αυξημένη έκφραση της β1-ιντεγκρίνης, η ρυθμιστική επίδραση των μακροφάγων/μικρογλοιακών κυττάρων και η ενίσχυση της έκκρισης νευροτροφικών παραγόντων, με τη μεσολάβηση των MSCs, μπορεί να συμβάλλουν στην επαγωγή νέων αγγείων(Ding et al. 2007). Άλλοι τροφικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα MSCs που πιθανώς συνέβαλαν στην ενισχυμένη αγγειογένεση περιλαμβάνουν τους VEGF, BDNF, IGF-1, bFGF, GDNF και TGF(Michael W. Irvin, Andries Zijlstra 2014). Επιπλέον, τα adipose tissue derived mesenchymal stem cells (Ad-MSCs) θα μπορούσουν να διαφοροποιηθούν σε φαινότυπο ενδοθηλιακών κυττάρων όπως αποδεικνύεται από τη χρώση vWF (von Willebrand factor) (Leu et al. 2010) Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η οδός σηματοδότησης Notch εμπλέκεται στην αγγειογένεση που προκαλείται από MSCs στον ισχαιμικό εγκέφαλο (Guo et al. 2012)

Τροποποίηση της φλεγμονώδους και της ανοσολογικής απόκρισης :

Μετά την ενδοφλέβια ένεση των Ad-MSCs σε μοντέλο εγκεφαλικού αρουραίου, οι εκφράσεις του mRNA της IL-18, TLR-4 και του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου (PAI)-1 στην περιοχή του εγκεφάλου με έμφραγμα, οι δείκτες φλεγμονής, μειώθηκαν σημαντικά (Leu et al. 2010) Τα hBMSCs έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν προς τα πάνω την έκφραση της IL-10 σε ένα μοντέλο ισχαιμίας πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου, το οποίο πιθανώς ευθύνεται για την εξασθένηση της αστρογλοιακής αντιδραστικότητας, την αντιαποπτωτική δράση και τη νευρογένεση(J. Li et al. 2010). Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs μειώνουν την έκφραση του MCP-1 και την επακόλουθη διήθηση των μακροφάγων CD68+ στον ισχαιμικό εγκέφαλο, ενώ η μεταμόσχευση των MSCs που έχουν αποσιωπηθεί με Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) δεν μπορεί να ασκήσει παρόμοια αποτελέσματα. (Yoo et al. 2013)

4.5 Βλαστικά κύτταρα Μυελού των Οστών (BMSC):

Τα βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών (BMSC) ερευνήθηκαν για χρήση σε θεραπείες εγκεφαλικού επεισοδίου λόγω της ανακάλυψης ότι τα BMSCs μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα in vitro (Connor et al. 2000). Αργότερα in vivo μελέτες έδειξαν ότι τα BMSCs, μετά από ενδοεγκεφαλική μεταμόσχευση σε μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου, θα μπορούσε να μεταναστεύσουν στη θέση της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης και να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα (J. Chen, Li, et al. 2001).



Εικόνα 7: (Α) Ανοσοφθορισμός υποκοιλιακών ζωνών για την αποκάλυψη νευρογένεσης χρησιμοποιώντας DCX και Ki-67. Εμφανίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες διαφορετικών ομάδων που αντιστοιχούν στα ορθογώνια του σχήματος. (Β) Ανοσοφθορισμός της περιοχής περιξ του εμφράγματος για την αξιολόγηση της αγγειογένεσης χρησιμοποιώντας CD31 και Ki-67. Εμφανίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των διαφορετικών ομάδων που αντιστοιχούν στα ορθογώνια του σχήματος. (Xiong et al. 2018)

Πρόσθετες in vivo μελέτες διερεύνησαν τις μεταναστευτικές ικανότητες των BMSC και έδειξαν ότι τα BMSCs που χορηγείται ενδοαρτηριακά (IA) και ενδοφλέβια (IV) έχουν την ικανότητα να μεταναστεύσουν στον εγκέφαλο (Iihoshi et al. 2004). Στα μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου τόσο η IA όσο και η IV χορήγηση των

BMSCs οδήγησαν σε μεγαλύτερη λειτουργική ανάκαμψη, που αποδίδεται στη συσσώρευση των BMSCs στο σημείο του ισχαιμικού (Iihoshi et al. 2004). Ενώ αρχικά διερευνήθηκε για τη δυνατότητά τους να συνεισφέρουν νέους νευρώνες, φαίνεται τελικά να μη συμβάλλουν στην αντικατάσταση των νευρώνων. Αντίθετα, τα BMSCs έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνουν παράγοντες που προάγουν τη νευρογένεση και καταστέλλουν τη φλεγμονή, ενισχύοντας την ενδογενή ανάκαμψη. Σε μοντέλα εγκεφαλικού σε ποντίκια, τα BMSCs έχουν αποδειχθεί ρυθμίζουν προς τα πάνω την παραγωγή νευροτροφινών και αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται με τη νευροαποκατάσταση και τα παρατηρούμενα θεραπευτικά οφέλη (Qu et al. 2007).

Οι θεραπείες με BMSCs που χρησιμοποιούν χορήγηση IA ή IV κυριαρχούν στις κλινικές δοκιμές, κάτι που πιθανώς αντανακλά την ασφάλειά τους και τις λιγότερο αυστηρές τεχνικές απαιτήσεις σε σύγκριση με τις ενδοεγκεφαλικές μεταμοσχεύσεις. Όσον αφορά την ασφάλεια των BMSCs που χορηγούνται για τη θεραπεία του εγκεφαλικού επεισοδίου δεν αναφέρθηκαν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες (Friedrich et al. 2012) Παρόμοια με τη χορήγηση IA, η ενδοφλέβια χορήγηση ήταν ασφαλής. Οι μελέτες της ενδοφλέβιας χορήγησης δεν απέδωσαν ανεπιθύμητες ενέργειες σχετιζόμενες με τη θεραπεία, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν βελτιώσεις στα νευρολογικά αποτελέσματα (Savitz et al. 2019) Αν και τα μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου σε ζώα έδειξαν βελτιώσεις μετά από χορήγηση IA ή IV των BMSCs, τα ίδια αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη παρατηρηθεί σε ανθρώπους ασθενείς.

Οι διαφορές μεταξύ ζωικών μοντέλων και αποτελεσμάτων ασθενών μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στο χρόνο χορήγησης BMSCs. Οι προκλινικές μελέτες που έδειξαν βελτιωμένα νευρολογικά αποτελέσματα με τη θεραπεία BMSCs συχνά χορηγούσαν BMSCs IA ή IV εντός τριών ημερών από το εγκεφαλικό επεισόδιο (Y. Li et al. 2001). Μια μελέτη χρονικής πορείας της χορήγησης BMSCs σε αρουραίους με ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια έδειξε ότι δεν σημειώθηκε νευρολογική βελτίωση όταν άρχισε η θεραπεία μετά από επτά ημέρες (de Vasconcelos dos Santos et al. 2010).

Πριν από τις κλινικές δοκιμές για εγκεφαλικό επεισόδιο, τα BMSCs χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της ισχαιμικής καρδιακής νόσου, η επιτυχία των οποίων έχει επηρεάσει τον σχεδιασμό κλινικών δοκιμών που στοχεύουν στο εγκεφαλικό (Savitz et al. 2019) Ωστόσο, προκλινικά και κλινικά αποτελέσματα από θεραπείες

BMSCs για έμφραγμα του μυοκαρδίου προτείνουν ένα παράθυρο για παρέμβαση που μπορεί να μην αντικατοπτρίζει το εγκεφαλικό επεισόδιο

4.6 Αίμα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου hUCB:

Το αίμα του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (hUCB) περιέχει κύτταρα MSCs και έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει ισχυρούς ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες. Το hUCB αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι διασώζει εν μέρει τα ελλείμματα συμπεριφοράς σε μοντέλα ισχαιμικών αρουραίων (J. Chen, Sanberg, et al. 2001). Μετά την πρόκληση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου σε αρουραίους, το ενδοφλεβίως χορηγούμενο hUCB μετανάστευσε κατά προτίμηση στο σημείο του ισχαιμικού τραυματισμού και η θεραπεία με hUCB συσχετίστηκε με μειωμένο όγκο αλλοιώσεων (Vendrame et al. 2004). Παρόλο που βρέθηκαν ανθρώπινα κύτταρα που μοιάζουν με νευρώνες σε μοντέλα ισχαιμικών αρουραίων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με hUCB, ήταν λίγα σε αριθμό, υποδηλώνοντας θεραπευτικές επιδράσεις με τη μεσολάβηση του hUCB μέσω τροφικών παραγόντων και κυτοκινών, αντί της κυτταρικής αντικατάστασης (J. Chen, Sanberg, et al. 2001)

Το hUCB περιέχει πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, αλλά φάνηκε πως στα παρατηρούμενα θεραπευτικά οφέλη εμπλέκεται ένας μοναδικός πληθυσμός κυττάρων MSCs, ο οποίος παρουσίασε ιδιότητες αυτοανανέωσης, αλλά δεν διέθετε δείκτες κυτταρικής επιφάνειας που είναι χαρακτηριστικοί των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και ταξινομήθηκαν ως μη αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα αίματος ομφάλιου λώρου (nh-UCBSCs). Σε μοντέλα εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου τα nh-UCBSCs αποδείχθηκε ότι μειώνουν τον όγκο της βλάβης και βελτιώνουν τα ελλείμματα συμπεριφοράς, παρόμοια με τα αποτελέσματα που παρατηρούνται με το hUCB, αλλά με την πρόσθετη ικανότητα για in vitro επέκταση (Xiao et al. 2005).

Μηχανισμός:

Η διερεύνηση των θεραπευτικών ιδιοτήτων των nh-UCBSCs αποκάλυψε ότι υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα μετά από θεραπεία με nh-

UCBSCs. Σε αρουραίους με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, η θεραπεία με nh-UCBSCs οδήγησε σε μείωση του αριθμού των φλεγμονωδών μακροφάγων και μικρογλοίων στον εγκέφαλο και επέστρεψε τα αυξημένα επίπεδα T-κυττάρων, NK κυττάρων και ουδετερόφιλων στα επίπεδα πριν από το εγκεφαλικό επεισόδιο. Η μείωση των επιπέδων των φλεγμονωδών ανοσοκυττάρων συσχετίστηκε με βελτιωμένη νευρολογική λειτουργία σε αρουραίους, γεγονός που υποδηλώνει ότι με την άμβλυνση της φλεγμονής μετά το εγκεφαλικό επεισόδιο τα nh-UCBSCs μπορεί να ανακουφίσουν την έξαρση του αρχικού τραυματισμού και να προωθήσουν την ανάρρωση (Shiao et al. 2019). Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και την ικανότητά τους για επέκταση *in vitro*, τα UCBSCs και το hUCB έχει αποδειχθεί ότι είναι ανοσολογικά ανεκτικά, καθιστώντας τα εύκολα εφαρμόσιμα ως αλλογενή κυτταρική θεραπεία (Kim and Broxmeyer 2011)

4.7 Βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολφού (DPSCs):

Τα ανθρώπινα DPSCs είναι τα βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία και βρίσκονται στους περιαγγειακούς θώκους (niches) του οδοντικού πολφού και αποτελούν ελκυστική κυτταρική πηγή επειδή μπορούν εύκολα να ληφθούν ως ιατρικά απόβλητα χωρίς ηθικές ή υλικοτεχνικές επιπλοκές. Καθώς τα ανθρώπινα DPSCs προέρχονται από τη νευρωνική γενεαλογία, θεωρούνται μια ιδιαίτερα υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία σοβαρών νευρολογικών διαταραχών. Η απομόνωση DPSCs από εξαγόμενα δόντια εκτελείται εύκολα και λιγότερο επεμβατικά από την απομόνωση των BMSCs. Τα DPSCs εκφράζουν μια ποικιλία δεικτών κυτταρικής επιφάνειας παρόμοιους με τα BMSCs και εμφανίζουν επίσης περίπου τρεις φορές υψηλότερο πολλαπλασιασμό *in vitro* από τα ανθρώπινα κύτταρα BMSCs (Ponnaiyan and Jegadeesan 2014), είναι πολυδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μύες, χόνδρους, οστά και άλλους κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον, τα DPSCs έχει επίσης αποδειχθεί ότι ασκούν ισχυρές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες μέσω της αναστολής των ενεργοποιημένων αποκρίσεων των T-κυττάρων καθιστώντας τα ελκυστικά για χρήση σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις. Οι νευροτροφικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα DPSCs εμπλέκονται σε διεργασίες που διαμεσολαβούνται από τον (NGF), τη νευροτροφίνη-3, BDNF, GDNF, VEGF επάγοντας την επιβίωση των νευρώνων, τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση. (Suda et al. 2020) Τα DPSCs εμφανίζουν ιδιότητες τόσο των νευρικών βλαστικών κυττάρων όσο και των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs), με αναφερόμενη χρησιμότητα για τη θεραπεία της εγκεφαλικής ισχαιμίας (Suda et al. 2020) Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταμόσχευση DPSCs σχετίζεται με νευροπροστατευτικά αποτελέσματα και ενισχύει τη λειτουργική αποκατάσταση μετά από εγκεφαλική ισχαιμία in vivo. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες βασικές επιστημονικές μελέτες για να επιβεβαιωθεί μια ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος για μεταμόσχευση DPSCs κατά την οξεία φάση μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Αναφορά-Ημερομηνία	Τύπος κυττάρου	Μοντέλο	Τρόπος χορήγησης	Αποτελέσματα
NSCs				
(Kelly et al. 2004)	fetal hNSC	rMCAO	intracerebral	3. Βελτίωση νευρολογικής λειτουργίας 4. Νευρωνική διαφοροποίηση
(Chu et al. 2004)	hNSC	rMCAO	Intravenous	5. Βελτίωση νευρολογικής λειτουργίας 6. Μετανάστευση και διαφοροποίηση προς νευρώνες και αστροκύτταρα
(Takahashi et al. 2008)	Embryonic NSC	rMCAO	intracerebral	7. Όγκος εμφράκτου ↓ 8. Βελτίωση νευρολογικής λειτουργίας 9. Κυτταρική αντικατάσταση 10. νευροτροφικές επιδράσεις
MSCs				
(Li et al. 2001)	MSC	rMCAO	Intra-arterial	● Καλύτερη νευρολογική έκβαση ● Διαφοροποίηση σε αστροκύτταρα

				και νευρώνες
(Ukai et al. 2007)	pMSC	rMCAO	Intravenous	11. Όγκος εμφράκτου ↓ 12. Καλύτερη νευρολογική έκβαση 13. Επαγωγή αγγειογένεσης
(Zhao et al. 2006)	Gene-transferred MSCs	rMCAO	intracerebral	14. Όγκος εμφράκτου ↓ 15. Καλύτερη νευρολογική έκβαση 16. Νευροπροστασία
ESCs				
(Wei et al. 2005)	mESCs	rMCAO	intracerebral	17. Όγκος εμφράκτου ↓ 18. Καλύτερη νευρολογική έκβαση 19. Διαφοροποίηση σε νευρώνες
(Yanagisawa et al. 2006)	mESCs	rMCAO	Intracerebral (ipsilateral striata)	20. Βελτίωση ντοπαμινεργικής λειτουργίας 21. Βελτίωση συμπεριφοράς
(Wei et al. 2005)	mESCs	rMCAO	22. intracerebral (post infarct brain cavity) 23. direct injection of iPS into damaged areas	<ul style="list-style-type: none"> ● Λειτουργική βελτίωση ● Διαφοροποίηση σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα
iPSCs				
(S. J. Chen et al. 2010)	iPS mixed with fibrin glue (iPS-FG)	rMCAO	Subdural transplantation	<ul style="list-style-type: none"> ● Λειτουργική βελτίωση (κινητική) ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Νευροπροστασία ● Φλεγμονή↓

(Kawai et al. 2010)	Undifferentiated iPS cells	mMCAO	intracerebral (ipsilateral striatum)	Πολλά υποσχόμενη πηγή νευρικών κυττάρων μετά από ΙΑΕΕ, εάν η ογκογένεση ελέγχεται σωστά
BMSCs				
(Toyoshima et al. 2015)	Rat BMSCs	Rat MCAO	Intra-arterial	24. Όγκος εμφράκτου ↓ 25. Καλύτερη νευρολογική έκβαση 26. Αύξηση νευροτροφικών παραγόντων
(Nakazaki et al. 2019)	Rat BMSCs	Spontaneously hypertensive rat (stroke-prone) (SHRSP) model	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Διαταραχή του ΑΕΦ ↓ ● Ατροφία εγκεφάλου ↓ ● Συσσώρευση β-αμυλοειδούς ↓ ● Γνωστική λειτουργική αποκατάσταση ↑
(Tobin et al. 2020)	Interferon-γ-activated BMSCs	Rat MCAO	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Νευρολογική έκβαση ↑ ● Εγκεφαλική ροή αίματος ↑ ● Ολιγοδενδρογένεση ↑ ● Ρύθμιση φλεγμονής
DPSCs				
(Song et al. 2017)	Human DPSCs	Rat MCAO	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Καλύτερη νευρολογική έκβαση ● Διαφοροποίηση σε αστροκύτταρα και κύτταρα όμοια με νευρώνες

				<ul style="list-style-type: none"> ● Προώθηση αγγειογένεσης
(Nito et al. 2018)	Human DPSCs	Rat MCAO	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Καλύτερη νευρολογική έκβαση ● Τροποποίηση της φλεγμονής
hUCB				
(Vendrame et al. 2004)	HUCBC	Rat MCAO	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Καλύτερη νευρολογική έκβαση
(J. Chen et al. 2001)	HUCBC	Rat MCAO	Intravenous	<ul style="list-style-type: none"> ● Όγκος εμφράκτου ↓ ● Καλύτερη νευρολογική έκβαση (συμπεριφορά, εργασίες περιστροφής και σύλληψης)

Πίνακας 4: Παραδείγματα μελετών με τη χρήση διαφόρων κατηγοριών βλαστικών κυττάρων, παραθέτοντας το μοντέλο, τρόπο χορήγησης και τα αποτελέσματα της κάθε μίας. (MCAO: Middle cerebral artery occlusion)

4.8 Ανησυχίες (Σχήμα 11):

4.8.1 Κυτταρική Εγκατάσταση

Η ενδοφλέβια ένεση κυττάρων σε αρουραίους μετά από εγκεφαλική ισχαιμία είχε ως αποτέλεσμα υψηλή συσσώρευση κυττάρων σε εσωτερικά όργανα όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ και ο σπλήνας (Lappalainen et al. 2008). Η ενδοαρτηριακή έγχυση συνήθως συνοδεύτηκε από υψηλή συχνότητα μικροαπόφραξης, αν και μπορούσε να παρακάμψει τα όργανα φιλτραρίσματος (Levitt et al. 2003). Οι προσεγγίσεις για τη βελτίωση της φιλοξενίας των κυττάρων και της αποτελεσματικότητας της κυτταρικής θεραπείας περιλαμβάνουν:

- Ταξινόμηση κυττάρων
- Τροποποιημένες συνθήκες καλλιέργειας
- Τροποποιήσεις κυτταρικής επιφάνειας.

Ο εμπλουτισμός των NSCs από το FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting) για την επιφανειακή ντεγκρίνη CD49d έχει αποδειχθεί ότι προάγει την κυτταρική εστία στην περιοχή του εγκεφαλικού σε ποντίκια και βελτιώνει την αποκατάσταση της συμπεριφοράς (Hao et al. 2014b). Η μηχανική κυτταρικής επιφάνειας μπορεί επίσης να στοχεύσει σε ιστό ενδιαφέροντος. Τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (προνάση) θα μπορούσαν να τροποποιήσουν παροδικά τις πρωτεΐνες προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας (H. J. Lee et al. 2009).

4.8.2 Κυτταρική Επιβίωση

Διάφοροι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την κυτταρική επιβίωση στην οξεία φάση του εγκεφαλικού εμφράγματος, όπως η περιορισμένη παροχή αίματος, η υποξία, η ανεπάρκεια τροφικού παράγοντα, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονώδης απόκριση και άλλοι. Η γονιδιακή τροποποίηση με διάφορους παράγοντες όπως το Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) και το PIGF (Placental Growth Factor) προώθησε σημαντικά την επιβίωση των ESCs και των MSCs (Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown and Sheean 2008). Η υπερέκφραση των γονιδίων του αυξητικού παράγοντα συμπεριλαμβανομένων των VEGF, GDNF, BDNF και Akt1 μπόρεσε να προάγει σημαντικά την επιβίωση των NSCs στο μοντέλο ζώων με εγκεφαλικό (H. J. Lee et al. 2010). Η προετοιμασία με IL-6 προστάτευσε τα μοσχευμένα NSCs από τραυματισμό ισχαιμικής επαναιμάτωσης σε μοντέλο ισχαιμικού εγκεφαλικού ποντικού (Sakata et al. 2012). Η επιβίωση, η πολλαπλασιαστική ικανότητα και οι παρακρινικές επιδράσεις των NSCs ενισχύθηκαν από την προετοιμασία με μινοκυκλίνη όταν μεταμοσχεύθηκαν ενδοεγκεφαλικά σε εγκεφαλικό εγκεφαλικό επεισόδιο, γεγονός που οφείλεται στη βελτιωμένη νευρολογική ανάκαμψη σε σύγκριση με τα μη ρυθμισμένα NSCs. Πρόσφατα, η μεταγωγή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ TAT 70 (Hsp70) in vitro, η οποία μειώνει την απόπτωση και τη φλεγμονή μετά από υποξικό-ισχαιμικό τραυματισμό, ενισχύει σημαντικά την επιβίωση

των NSCs που μεταμοσχεύθηκαν ενδοεγκεφαλικά σε εγκέφαλο ποντικών μετά από εγκεφαλικό (Doerrner et al. 2012).

4.8.3 Ασφάλεια

Αν και οι τρέχουσες κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι η θεραπεία με βλαστοκύτταρα για εγκεφαλικό επεισόδιο είναι εφικτή και ασφαλής, τα ισχυρά επιστημονικά δεδομένα είναι ακόμα ελλιπή. Η ασφάλεια αποτελεί κρίσιμη ανησυχία πριν επιτραπεί η εκτεταμένη χρήση των βλαστοκυττάρων στην κλινική πράξη.

4.8.4 Γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία που βασίζεται σε βλαστοκύτταρα αντιπροσωπεύει μια νέα πιθανή θεραπευτική στρατηγική για το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο στο μέλλον. Τα βλαστοκύτταρα από μόνα τους μπορούν να εκκρίνουν διάφορους νευροτροφικούς παράγοντες εκτός από τα οχήματα μεταφοράς γονιδίων. Η μεταμόσχευση γονιδιακά τροποποιημένων βλαστοκυττάρων που υπερεκφράζουν ποικίλους νευροτροφικούς παράγοντες όπως VEGF, BDNF, GDNF, PIGF, ANG-1, HGF, NGF, EPO και noggin έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει σημαντικά τη λειτουργική αποκατάσταση στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε σύγκριση μόνο με τα βλαστοκύτταρα (πίνακας 5) (H. J. Lee et al. 2007)

Τύπος νευροτροφικού παράγοντα	Τύπος κυττάρου	Αποτέλεσμα
Νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Μειώσουν όγκου εμφράκτου ● Βελτίωση κινητικής λειτουργίας ● Καλύτερη επιβίωση και διαφοροποίηση του νευρικού ιστού (μέσω αύξησης Bcl-2 και μείωσης της Bax) ● Προάγει την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ● Προάγουν την επιμήκυνση των νευραξόνων

Νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από γλοία (GDNF)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Μειώσουν όγκου εμφράκτου ● Βελτίωση κινητικής λειτουργίας ● Επιβίωση των νευρώνων (Ενεργοποίηση του υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης)
Παράγοντας Ανάπτυξης Νεύρων (NGF)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Επιβίωση των νευρικών κυττάρων ● Βελτίωση νευρολογικών ελλειμμάτων ● Συσχέτιση με πρόιμη νευρογένεση και τη δημιουργία ορισμένων νευροπεπτιδίων
Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF)	NSC	<ul style="list-style-type: none"> ● διαφοροποίηση και επιβίωση των NSC ● αγγειογένεση
Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF)	MSC DPSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Μειώσουν όγκου εμφράκτου ● Βελτίωση κινητικής λειτουργίας ● Άμβλυνσηκαταστροφής του ΑΕΦ (προστατεύοντας συνδετικές πρωτείνες όπως η οκλουδίνη)
Αυξητικός παράγοντας πλακούντα (PIGF)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Μειώσουν όγκου εμφράκτου ● Βελτίωση κινητικής λειτουργίας ● αγγειογένεση
Αγγειοποιητίνη-1 (ANG-1)	MSCs	<ul style="list-style-type: none"> ● Αγγειογένεση ● Διατήρηση ακεραιότητας ΑΕΦ
Ερυθροποιητίνη (EPO)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Επιβίωση των νευρικών κυττάρων ● Βελτίωση νευρολογικών ελλειμμάτων ● αντιοξειδωτικές, αντι-αποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις
Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Μειώσουν όγκου εμφράκτου ● Βελτίωση κινητικής λειτουργίας ● νευροπροστατευτικό και αγγειοπροστατευτικό ρόλο (μείωση προφλεγμονωδών σημάτων και προς τα άνω ρύθμιση αντιαποπτωτικών πρωτεινών)

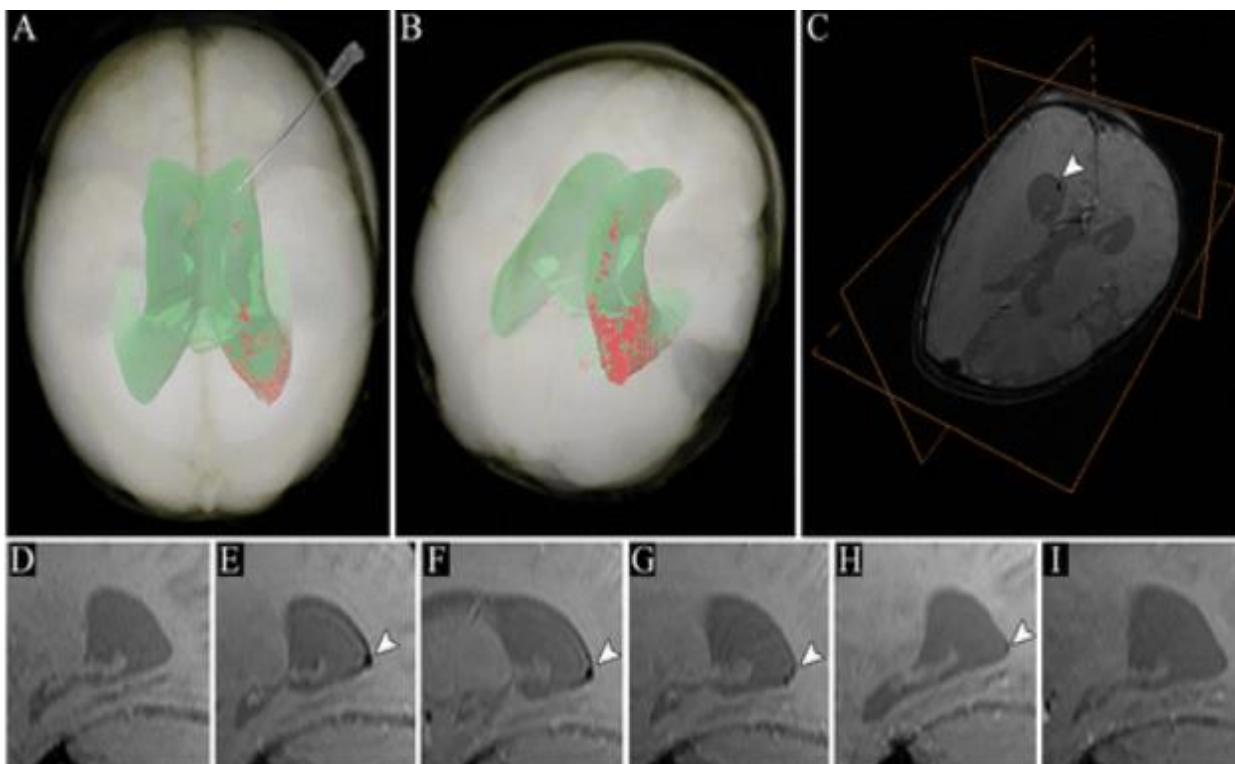
Noggin	MSC	<ul style="list-style-type: none"> ● Βελτίωση νευρολογικών ελλειμμάτων ● προάγει τη διαφοροποίηση των MSC σε νευρώνες ● Καταστολή της απόπτωσης και φλεγμονής μέσω των οδών πρωτεϊνικής κινάσης B/γλυκογόνο συνθάσης κινάσης 3 βήτα (Akt/GSK3β) και πρωτογενούς απόκρισης 88 (TLR4/MyD88) υποδοχέα 4/διαφοροποίησης μυελοειδούς στο μοντέλο αρουραίου
--------	-----	--

Πίνακας 5: Ενδεικτικά ευεργετικά αποτελέσματα γονιδιακά τροποποιημένων βλαστοκυττάρων που υπερεκφράζουν ποικίλους νευροτροφικούς παράγοντες μετά από μεταμόσχευση σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. (Suda et al. 2020)

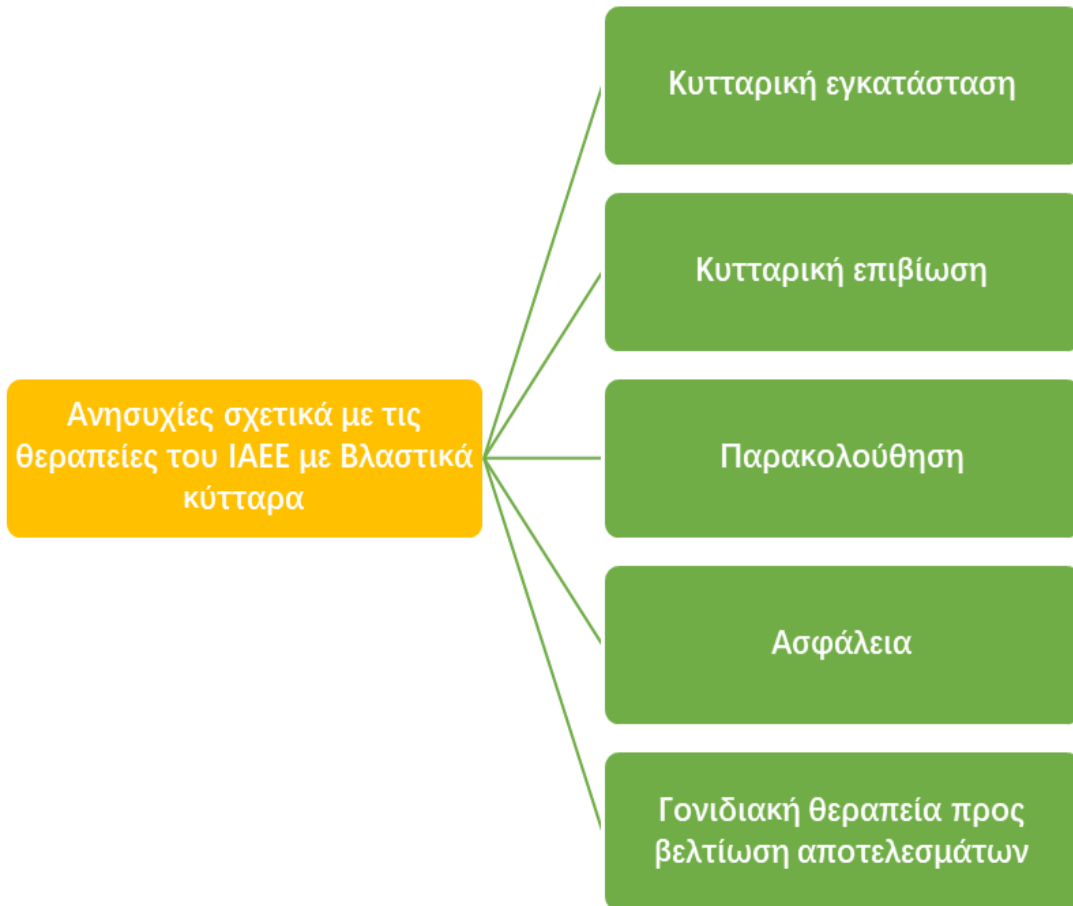
4.9 Παρακολούθηση κυττάρων

Η *in vivo* παρακολούθηση κυττάρων αποτελεί επίσης ένα άλυτο κρίσιμο ζήτημα. Διάφορες τεχνικές σήμανσης κυττάρων, για παράδειγμα, φθορίζουσες πρωτεΐνες, οξείδιο σιδήρου, παράγοντες που περιέχουν σίδηρο (π.χ. Feridex), μαγνητοδενδριμερή, σωματίδια συζευγμένα με πεπτίδια Tat και παραμαγνητικά σωματίδια (πενταοξικό οξύ γαδολίνιο-διαιθυλενο τριαμίνης [Gd-DTPA]) (Bulte et al. 2001), καθιστούν δυνατή την παρακολούθηση της μοίρας και της μετανάστευσης των κυττάρων σε συνδυασμό με μαγνητική τομογραφία μετά τη μεταμόσχευση. Υπάρχουν πλεονεκτήματα και ελλείψεις όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της επισήμανσης, τις τοξικές επιδράσεις, την κατασκευή και την ευαισθησία. Για παράδειγμα, η απλή κυτταρική ενδοκυττάρωση και οι μέθοδοι επιμόλυνσης που προκαλούνται από λιποφεκταμίνη έχουν χαμηλή απόδοση σήμανσης (Rudelius et al. 2003). Έχει αποδειχθεί ότι οι παραμαγνητικές ουσίες, όπως το οξείδιο του σιδήρου, ήταν επιβλαβείς για τη σηματοδότηση και τη λειτουργία των κυττάρων (Ward et al. 2002). Τα μαγνητοδενδριμερή και τα σωματίδια συζευγμένα με τα πεπτίδια Tat απαιτούν περίπλοκες μεθόδους παρασκευής. Η απεικόνιση single-photon emission computerized tomography (SPECT) επιτρέπει μελέτες βιοκατανομής σε

ολόκληρο το σώμα με βάση την επισήμανση κυττάρων με ^{111}In -oxine. Αυτή η τεχνική έχει επίσης το πλεονέκτημα της υψηλής ευαισθησίας, των σύντομων χρόνων σάρωσης και της επαναλαμβανόμενης σάρωσης για αρκετές ημέρες. Το μειονέκτημα περιλαμβάνει κυρίως την τοξικότητα και το λαμβανόμενο σήμα μπορεί να προέρχεται από κυτταρικά υπολείμματα και όχι από επιζώντα κύτταρα (Khalil et al. 2011).



Εικόνα 8: Hydrogen 1 MRI cell-tracking 1 με χρήση direct labeling. Σε ασθενή με σφαιρική ισχαιμία εγχύθηκαν αυτόλογα κύτταρα ομφαλοπλακουντιακού αίματος σημασμένα με υπερπαραμαγνητικό οξείδιο του σιδήρου (SPIO). A, Απόδοση όγκου δεδομένων MRI της κεφαλής του ασθενούς που ελήφθησαν 24 ώρες μετά τη μεταμόσχευση. Η ημιαυτόματη κατάτμηση έντασης εικονοστοιχείων δείχνει το κοιλιακό σύστημα (πράσινο) και το σήμα SPIO που προέρχεται από κύτταρα εντός του ινιακού κέρατος της δεξιάς κοιλίας (κόκκινο). Η βελόνα δείχνει την διαδρομή και την τροχιά της μεταμόσχευσης κυττάρων μέσω του μετωπιαίου κέρατος. B, Ανώτερη όψη του κεφαλιού του ασθενούς. C, T2*-σταθμισμένη εικόνα επικεντρωμένη στο χαμηλό κυτταρικό σήμα SPIO στο ινιακό κέρασ (κεφαλή βέλους). D–I, Οβελιαία T2* δείχνουν τη χρονική πορεία του χαμηλού σήματος SPIO εντός του ινιακού κέρατος (αιχμή βέλους στο E–H). Ελήφθησαν εικόνες, D, πριν και, E, 24 ώρες, F, 7 ημέρες, G, 2 μήνες, H, 4 μήνες και, I, 33 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. (Janowski et al. 2014)



Σχήμα 11: Σύνοψη προβληματισμών σχετικά με τις θεραπευτικές μεθόδους με τη χρήση βλαστικών κυττάρων για την αντιμετώπιση του ΙΑΕΕ.

Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι νευρώνες που προέρχονται από μόσχευμα μπορούν να ενσωματωθούν λειτουργικά στα κυκλώματα του εγκεφάλου του ξενιστή έχουν συνδεθεί στενά με την ανάπτυξη νέων τεχνολογικών εργαλείων, επιτρέποντας τη διεξοδική μελέτη της λειτουργικής συνδεσιμότητας μεταξύ μοσχευμάτων και νευρώνες ξενιστή. Αυτά είναι τα εξής (Σχήμα 12):

- Η μονοσυναπτική ιχνηλάτηση νευρώνων με χρήση του ιού της λύσσας (Rabies virus)
- ο έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με:
 - a) οπτογενετική τεχνολογία

- b) καταγραφή των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου
- c) Συμβατικές τεχνικές όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία ή οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές.

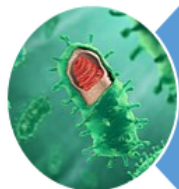
Ο ιός της λύσσας έχει την ικανότητα να εξαπλώνεται διασυναπτικά μεταξύ των νευρώνων. Οι συνδεδεμένοι νευρώνες μπορούν να στοχευθούν γενετικά χρησιμοποιώντας φορείς ιχνηλάτησης με νευρωνικούς προαγωγείς και υποδοχείς για συγκεκριμένους ιικούς φακέλους (Wickersham et al., 2007). Ο τεχνητός ιός της λύσσας που φέρει φθορίζουσες βαφές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση είτε κυττάρων με προσυναπτική σύνδεση με μοσχευμένα κύτταρα είτε για περιοχές του εγκεφάλου όπου οι νευρώνες ξενιστές έχουν λάβει συναπτικές επαφές από τους εμβολιασμένους νευρώνες (Palma-Tortosa et al. 2020). Νέες βελτιωμένες μέθοδοι για τον καθαρισμό του εγκεφαλικού ιστού, όπως το iDISCO (Μια απλή, γρήγορη μέθοδος για την ανοσοσήμανση μεγάλων δειγμάτων ιστού) ή το CUBIC (μια νέα τεχνολογία για εξαιρετικά αποτελεσματική τρισδιάστατη 3D χρώση και απεικόνιση ολόκληρου του οργάνου και ολόκληρου του σώματος), έχουν δώσει τη δυνατότητα εκτέλεσης απεικόνισης φθορισμού σε 3D χρωματισμένο ιστό, διατηρώντας τις ανατομικές δομές σε ολόκληρο τον εγκέφαλο ή τμήμα αυτού, επιτρέποντας την αντίχτυση προβολών μοσχεύματος και μονοσυναπτικών χαρτών εισόδου χωρίς την ανάγκη για λιγότερο ακριβή τομή και περαιτέρω ανακατασκευή του ιστού. (Doerr et al. 2017) Δυστυχώς, η ανάλυση αυτών των τεχνικών απεικόνισης δεν επιτρέπει την απεικόνιση προβολών ή συνδέσεων σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, αλλά έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες για μια γενική επισκόπηση της κατανομής των κυττάρων και των αξονικών προβολών τους.

Μόλις εντοπιστεί η θέση των νευρώνων ξενιστή που νευρώνουν τα μοσχευμένα κύτταρα, η λειτουργικότητα των συνδέσεών τους μπορεί να ελεγχθεί χρησιμοποιώντας παραδοσιακές εξωκυτταρικές ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε ζωντανά αναισθητοποιημένα ζώα ως απόκριση σε ένα προσαγωγό ερέθισμα (Tornerio et al. 2017). Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί οπτογενετικά εργαλεία για την τροποποίηση των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων συγκεκριμένου συνόλου νευρώνων που εκφράζουν πρωτεΐνες οψίνης ευαίσθητες στο φως συγκεκριμένου μήκους κύματος (Palma-Tortosa et al. 2021) Ομοίως, τα λεγόμενα DREADDs (designer receptors exclusively activated by

designer drugs), χρησιμοποιούν αδρανείς χημικούς συνδέτες για να ενεργοποιήσουν ή να αναστέλλουν τη νευρωνική δραστηριότητα (Palma-Tortosa et al. 2021). Αυτές οι δύο τελευταίες στρατηγικές μπορούν να συνδυαστούν με *in vivo* ηλεκτροφυσιολογία καθώς και με patch-clamp σε λεπτές τομές για να επιβεβαιωθεί η λειτουργική συναπτική συνδεσιμότητα μεταξύ των νευρώνων-ξενιστή και των μοσχευμένων κυττάρων. Επιπλέον, η σίγαση των μοσχευμένων κυττάρων με τη χρήση οπτογενετικών εργαλείων ή εργαλείων DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) επέτρεψε να αξιολογηθεί η συμβολή της νευρωνικής τους δραστηριότητας στη λειτουργική ανάκαμψη (Palma-Tortosa et al. 2020), ενώ η διέγερση νευρώνων που προέρχονται από μοσχεύματα χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό οπτογενετικής και DREADD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της λειτουργικής ενσωμάτωσής του στο κύκλωμα του ξενιστή (Yu et al. 2019)

Από την άλλη πλευρά, η απεικόνιση ασβεστίου με χρήση γενετικά κωδικοποιημένων δεικτών ασβεστίου GECIs (genetically encoded calcium indicators) επιτρέπει την ποσοτική παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας σε ζωντανά ζώα ενώ τα εκτίθενται σε αισθητηριακά ερεθίσματα (Linaro et al. 2019). Μαζί με το μικροσκόπιο δύο φωτονίων, οι GECIs επιτρέπουν υψηλή χρονική ανάλυση και ανάλυση μονών κυττάρων σε ένα τρισδιάστατο πλαίσιο. Επιπλέον, αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την αξιολόγηση σε πολλαπλά χρονικά σημεία χρησιμοποιώντας «παράθυρο» στο κρανίο των ζώων, καθιστώντας δυνατή την παρακολούθηση της δυναμικής της λειτουργικής ολοκλήρωσης των μεταμοσχευμένων νευρώνων. Αυτή η στρατηγική περιορίζεται στην παρακολούθηση των επιφανειακών στοιβάδων του φλοιού, παρόλο που η τεχνολογία προχωρά με ταχείς ρυθμούς για την επίτευξη συσκευών που επιτρέπουν την απεικόνιση βαθύτερων περιοχών του εγκεφάλου.

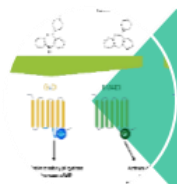
Στην ίδια γραμμή, οι ανταποκριτές βιοφωταύγειας είναι επίσης μια επικυρωμένη μέθοδος για τη μη επεμβατική παρακολούθηση των μοσχευμένων κυττάρων (Vogel et al. 2019). Παρά τη χαμηλότερη χωρική ανάλυση της *in vivo* απεικόνισης βιοφωταύγειας σε σύγκριση με την απεικόνιση ασβεστίου, η χρήση ειδικών προαγωγών κυτταρικού τύπου επιτρέπει τη μελέτη της κυτταρικής θεραπείας σε ζωικά μοντέλα. Αν και αυτή η στρατηγική δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργική ολοκλήρωση των νευρώνων, έχει δείξει πολλές δυνατότητες για τη μελέτη της ώριμης ηλικίας



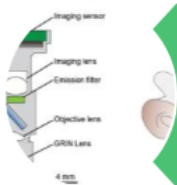
Μονοσυναπτική ιχνηλάτηση νευρώνων με χρήση του ιού της λύσσας (Rabies virus)



Έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές



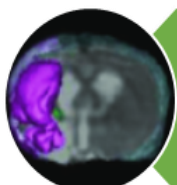
Έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με dREADDs



Έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με χρήση γενετικά κωδικοποιημένων δεικτών ασβεστίου (gCa1)



Έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με οπτογενετική τεχνολογία



Έλεγχος και η παρακολούθηση της νευρωνικής δραστηριότητας με βιοφωταυγεία

Σχήμα 12: Ενδεικτικές μέθοδοι ελέγχου ενσωμάτωσης των βλαστικών κυττάρων λειτουργικά στα κυκλώματα του εγκεφάλου του ξενιστή και μελέτης της λειτουργικής συνδεσιμότητας μεταξύ μοσχευμάτων και νευρώνων του ξενιστή.

5. Υλικά – μέθοδοι

Συμπεριλήφθηκαν τρεις κύριες βάσεις δεδομένων, οι PubMed, MEDLINE και EMBASE. Εντοπίστηκαν σχετικές μελέτες που δημοσιεύτηκαν από το παρελθόν έως σήμερα και επικεντρώνονται στον ρόλο της θεραπείας κυτταρικής υποκατάστασης με βλαστικά κύτταρα στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους όρους αναζήτησης μόνοι ή συνδυασμένοι: «Stem cell therapies for ischemic stroke», «stem-cell replacement therapy and stroke» και «stem-cell based therapies for stroke». Επιλέχθηκαν μόνο άρθρα στα αγγλικά. Συμπεριλήφθηκαν πληροφορίες σχετικά με το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και τα βλαστικά κύτταρα για την καλύτερη κατανόηση αυτών του όρων ώστε να είναι σαφή τα δεδομένα του ειδικού μέρους.

Συμπέρασμα-Νέες προοπτικές :

Δεδομένου ότι η πιθανή χρήση της θεραπείας με βλαστοκύτταρα σε ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο προτάθηκε για βελτιωμένη αποκατάσταση των λειτουργικών ελλειμμάτων, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πίσω από τα ευεργετικά της αποτελέσματα. Τα τελευταία 5 χρόνια, αρκετές μελέτες με μεταμόσχευση νευρικών προγόνων που προέρχονται από βλαστοκύτταρα σε ζωικά μοντέλα διαφορετικών ειδών εγκεφαλικής βλάβης έδειξαν τη δημιουργία ειδικών συναπτικών συνδέσεων από ξενιστή σε μόσχευμα και αντιστρόφως. Αυτές οι μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία της εξειδίκευσης των κυττάρων για τη δημιουργία του ακριβούς υποτύπου της νευρωνικής ταυτότητας για την ανακατασκευή κάθε περιοχής του εγκεφάλου. Ένας άλλος περιορισμός για την κλινική εφαρμογή κυτταρικών θεραπειών είναι ότι η εκτεταμένη *in vitro* επέκταση των κυτταρικών προϊόντων σχετίζεται με αυξημένη γενετική και επιγενετική αστάθεια, προτρέποντας για τυποποιημένες ρυθμίσεις κυτταροκαλλιέργειας για την ελαχιστοποίηση των γονιδιωματικών αλλοιώσεων.

Τα NSCs που έχουν μεταμοσχευθεί ενδοεγκεφαλικά έχουν δείξει ένα ισχυρό προφίλ ασφάλειας. Εν αναμονή των αποτελεσμάτων της κλινικής δοκιμής φάσης III, οι ενδοεγκεφαλικές μεταμοσχεύσεις NSCs μπορεί να προσφέρουν μια οδό για νευροαναγέννηση μέσω άμεσης αντικατάστασης χαμένων νευρώνων και σε σύγκριση με άλλες θεραπείες με βλαστοκύτταρα, μπορεί να παρέχουν το μεγαλύτερο παράθυρο για θεραπευτική παρέμβαση (Kalladka et al. 2016)

Η θεραπεία με BMSCs του εγκεφαλικού επεισοδίου έχει αποδειχθεί ασφαλής, αλλά κατά τα άλλα αναποτελεσματική σε κλινικές δοκιμές. Τα MSCs έχουν αποδειχθεί εξίσου ασφαλής, αλλά έχουν δείξει περιορισμένες βελτιώσεις για τους ασθενείς, ωστόσο, είναι ένας ετερογενής πληθυσμός και οι πιο πρόσφατα αναγνωρισμένοι τύποι, όπως τα UCBSCs, μπορεί να αποδειχθούν πιο αποτελεσματικοί (Shiao et al. 2019). Επιπλέον, επειδή τα MSCs μπορούν να επεκταθούν σε καλλιέργεια, μπορούν να τροποποιηθούν για να ενισχύσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και να προετοιμαστούν εκ των προτέρων ως αλλογονική θεραπεία, καλύπτοντας πιο εύκολα το παράθυρο για αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση (Hess et al. 2017). Αν και εξακολουθούν να χρειάζονται εξερεύνηση, οι θεραπείες με βλαστοκύτταρα για το εγκεφαλικό μπορεί να προσφέρουν τρόπους για την προστασία των νευρώνων που αντικαθιστούν προκειμένου να βελτιωθούν τα αποτελέσματα για ασθενείς με εγκεφαλικό.

Πρόσφατα χρησιμοποιώντας μοντέλο εγκεφαλικού επεισοδίου αρουραίου και κύτταρα που μοιάζουν με νευροεπιθηλιακά κύτταρα (neuroepithelial-like) ανθρώπινης προέλευσης προέκυψε ως αποτέλεσμα ότι η νευρωνική δραστηριότητα από μεταμοσχευμένα κύτταρα συμμετέχει στη διατήρηση της φυσιολογικής κινητικής λειτουργίας, συμβάλλοντας πιθανά στη βελτιωμένη ανάκαμψη των ζώων (Palma-Tortosa et al. 2020). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη αναδείχθηκε ότι σε καλλιέργειες φλοιού ενήλικου ανθρώπου συμβαίνει παρόμοια ενσωμάτωση σε περιβάλλον μεταμόσχευσης από άνθρωπο σε άνθρωπο (Grønning Hansen et al. 2020)

Αυτή η πρόοδος φέρνει τη θεραπεία με βλαστοκύτταρα πολύ κοντά στην κλινική εφαρμογή της για ασθενείς με εγκεφαλικό. Ωστόσο, θα χρειαστεί περαιτέρω πειραματική έρευνα για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία του βέλτιστου τύπου κυττάρου με στόχο την μέγιστη αποκατάσταση. Έχει ήδη γίνει κάποια προεργασία σε αυτόν τον τομέα στα πλαίσια της δημιουργίας ντοπαμινεργικών προγονικών

παραγόντων για τη θεραπεία της PD (Doi et al. 2020). Λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής κυττάρων ειδικών για τον ασθενή για αναγεννητικές θεραπείες, οι μελλοντικές στρατηγικές, πιθανότατα θα βασίζονται σε iPSCs τύπου ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA) ή σε κατασκευασμένες «καθολικές» γραμμές ESC, για να αποφευχθεί η ανάγκη για ανοσοκαταστολή (Piao 2021). Επί του παρόντος, έχει ήδη προταθεί η ιδέα της δημιουργίας τραπεζών κυττάρων από τις οποίες μπορούν να παραχθούν θεραπευτικά προϊόντα και να αντιστοιχιστούν ανοσολογικά με τους ασθενείς (J. Takahashi 2020)

Συνεπώς, για να προχωρήσουμε σε μελλοντικές κλινικές δοκιμές, θα ήταν κρίσιμο να αναπτυχθεί η κατάλληλη στρατηγική για την επιλογή ασθενών με εγκεφαλικό με βάση τη θέση και το μέγεθος της ισχαιμικής βλάβης, καθώς αυτό μπορεί να καθορίσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Επίσης η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με εγκεφαλικό είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ηλικιωμένοι, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα των μεταμοσχευμένων κυττάρων να ασκούν αποτελέσματα που προάγουν την αποκατάσταση. Σημειώνεται πως τα δεδομένα που λαμβάνονται με τη χρήση ζωικών μοντέλων μπορεί να μην μεταφραστούν απαραίτητα σε σημαντικές επιδράσεις σε κλινικό περιβάλλον.

Αν και οι περισσότερες μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η εξασθενημένη νευρική λειτουργία έχει βελτιωθεί σημαντικά μετά τη χορήγηση διαφόρων βλαστοκυττάρων, πολλά κρίσιμα ζητήματα πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν από την κλινική εφαρμογή. Για παράδειγμα, η βέλτιστη πηγή κυττάρων, η δοσολογία, η παρακολούθηση και η διαχείριση των ανεπιθύμητων ενεργειών πρέπει να καθοριστούν επείγοντως. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών των βλαστοκυττάρων στη θεραπεία του εγκεφαλικού θα βοηθήσει στην επίλυση των παραπάνω προβλημάτων, έτσι πλησιάζοντας ένα πολύ κομβικό σημείο από όπου για την κλινική εφαρμογή θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα κρίσιμα επιστημονικά και ηθικά ζητήματα, με τρόπο συνεργασίας μεταξύ βασικών επιστημών και κλινικής ιατρικής.

Περίληψη

Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αποτελεί ένα από τα κύρια αίτια νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως. Μέχρι σήμερα η θρομβεκτομή και η θρομβόλυση αποτελούν τις ενδεδειγμένες μεθόδους θεραπείας βοηθώντας μόνο στην οξεία φάση και όχι στην αποκατάσταση. Το εγκεφαλικό επεισόδιο αποτελεί μια νευρολογική οντότητα απώλειας πολλών κυτταρικών υποτύπων. Οι κυτταρικές θεραπείες με βλαστικά κύτταρα φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτικό ρόλο, περιορίζοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση, καθώς και νευροαναγεννητικό ρόλο μετριάζοντας την απώλεια νευρώνων. Δεδομένου ότι η πιθανή χρήση της θεραπείας με βλαστοκύτταρα προτάθηκε για βελτιωμένη αποκατάσταση των λειτουργικών ελλειμμάτων δεν έχουν ακόμα κατανοηθεί οι μηχανισμοί πίσω από τα ευεργετικά τους αποτελέσματα. Αν και οι περισσότερες μελέτες επιβεβαιώνουν τη βελτίωση της νευρικής λειτουργίας μετά τη χορήγηση διαφόρων βλαστοκυττάρων, πολλά κρίσιμα ζητήματα πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν από την κλινική εφαρμογή

Abstract

Stroke is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. To date, thrombectomy and thrombolysis are the appropriate methods of treatment, helping only in the acute phase but not in recovery. A stroke is a neurological entity in which many cellular subtypes are lost. Stem cell therapies appear to have a neuroprotective role, reducing the inflammatory response, as well as a neuroregenerative role by decreasing neuronal loss. Stem cell therapy has been proposed for improved repair of functional deficits, although the mechanisms behind their beneficial effects have not yet been understood. Most studies may confirm the improvement of neurological function after the administration of various stem cells but many critical issues need to be addressed before clinical application.

Βιβλιογραφία

- [1] Alia, Claudia et al. 2019. “Pluripotent Stem Cells for Brain Repair: Protocols and Preclinical Applications in Cortical and Hippocampal Pathologies.” *Frontiers in Neuroscience* 13(August).
- [2] Aly, Riham Mohamed. 2020. “Current State of Stem Cell-Based Therapies: An Overview.” *Stem Cell Investigation* 7(May): 1–10.
- [3] Amit, Michal et al. 2011. “Dynamic Suspension Culture for Scalable Expansion of Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells.” *Nature Protocols* 6(5): 572–79. <http://dx.doi.org/10.1038.nprot.2011.325>.
- [4] Amps, Katherine et al. 2011. “Screening Ethnically Diverse Human Embryonic Stem Cells Identifies a Chromosome 20 Minimal Amplicon Conferring Growth Advantage.” *Nature Biotechnology* 29(12): 1132–44.
- [5] Andres, Robert H. et al. 2011. “Human Neural Stem Cells Enhance Structural Plasticity and Axonal Transport in the Ischaemic Brain.” *Brain* 134(6): 1777–89.
- [6] Bacigaluppi, Marco et al. 2009. “Delayed Post-Ischaemic Neuroprotection Following Systemic Neural Stem Cell Transplantation Involves Multiple Mechanisms.” *Brain* 132(8): 2239–51.
- [7] Benjamin D. Granta, Chelsey A. Smithb, Philip E. Castlec, d, Michael E. Scheurere, and Rebecca Richards-Kortum. 2017. “乳鼠心肌提取 HHS Public Access.” *Physiology & behavior* 176(5): 139–48.
- [8] Bhasin, Ashu et al. 2013. “Stem Cell Therapy: A Clinical Trial of Stroke.” *Clinical Neurology and Neurosurgery* 115(7): 1003–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.10.015>.
- [9] Brown, Tim. 2008. “Deisign Thinking.” *Harvard Business Review* 86(6): 84–92.
- [10] Buck, Brian H. et al. 2008. “Early Neutrophilia Is Associated with Volume of Ischemic Tissue in Acute Stroke.” *Stroke* 39(2): 355–60.
- [11] Bulte, Jeff W.M. et al. 2001. “Magnetodendrimers Allow Endosomal Magnetic Labeling and in Vivo Tracking of Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 19(12): 1141–47.
- [12] Chen, Jieli, Paul R. Sanberg, et al. 2001. “Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral Deficits after Stroke in Rats.” *Stroke* 32(11): 2682–88.
- [13] Chen, Jieli, Yi Li, et al. 2001. “Therapeutic Benefit of Intracerebral Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells after Cerebral Ischemia in Rats.” *Journal of the Neurological Sciences* 189(1–2): 49–57.
- [14] Chen, Lukui et al. 2016. “Clinical Efficacy and Meta-Analysis of Stem Cell Therapies for Patients with Brain Ischemia.” *Stem Cells International* 2016.
- [15] Chen, Shih Jen et al. 2010. “Functional Improvement of Focal Cerebral Ischemia Injury by Subdural Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells with Fibrin Glue.” *Stem Cells and Development* 19(11): 1757–67.
- [16] Chu, Kon et al. 2004. “Human Neural Stem Cells Improve Sensorimotor Deficits in the Adult Rat Brain with Experimental Focal Ischemia.” *Brain Research* 1016(2): 145–53.
- [17] Choi, Jiho. 2016. “乳鼠心肌提取 HHS Public Access.” *Physiology & behavior* 176(1): 100–106.

- [18] Connolly, E. Sander et al. 1996. “Cerebral Protection in Homozygous Null ICAM-1 Mice after Middle Cerebral Artery Occlusion. Role of Neutrophil Adhesion in the Pathogenesis of Stroke.” *Journal of Clinical Investigation* 97(1): 209–16.
- [19] Connor, W E et al. 2000. “References and Notes 1.” 290(DECEMBER).
- [20] Coupland, Alexander P. et al. 2017. “The Definition of Stroke.” *Journal of the Royal Society of Medicine* 110(1): 9–12.
- [21] Cribbs, Adam P., and Sumeth M.W. Perera. 2017. “Science and Bioethics of CRISPR-CAS9 Gene Editing: An Analysis towards Separating Facts and Fiction.” *Yale Journal of Biology and Medicine* 90(4): 625–34.
- [22] Darsalia, Vladimer et al. 2011. “Cell Number and Timing of Transplantation Determine Survival of Human Neural Stem Cell Grafts in Stroke-Damaged Rat Brain.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31(1): 235–42.
- [23] Ding, Dah Ching et al. 2007. “Enhancement of Neuroplasticity through Upregulation of B1-Integrin in Human Umbilical Cord-Derived Stromal Cell Implanted Stroke Model.” *Neurobiology of Disease* 27(3): 339–53.
- [24] Doepfner, Thorsten R. et al. 2012. “Transduction of Neural Precursor Cells with TAT-Heat Shock Protein 70 Chaperone: Therapeutic Potential against Ischemic Stroke after Intrastratial and Systemic Transplantation.” *Stem Cells* 30(6): 1297–1310.
- [25] Doerr, Jonas et al. 2017. “Whole-Brain 3D Mapping of Human Neural Transplant Innervation.” *Nature Communications* 8: 1–7.
- [26] Doi, Daisuke et al. 2020. “Pre-Clinical Study of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitor Cells for Parkinson’s Disease.” *Nature Communications* 11(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>.
- [27] Dullens, Boudewijn et al. 2020. “Cancer Surveillance in Healthy Carriers of Germline Pathogenic Variants in BRCA1/2: A Review of Secondary Prevention Guidelines.” *Journal of Oncology* 2020.
- [28] Ehrenreich, Hannelore et al. 2009. “Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke.” *Stroke* 40(12).
- [29] Englund, Ulrica et al. 2002. “Grafted Neural Stem Cells Develop into Functional Pyramidal Neurons and Integrate into Host Cortical Circuitry.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26): 17089–94.
- [30] Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown, Mark, and Sheean. 2008. “基因的改变NIH Public Access.” *Bone* 23(1): 1–7.
- [31] Friedrich, Mauricio A.G. et al. 2012. “Intra-Arterial Infusion of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients with Moderate to Severe Middle Cerebral Artery Acute Ischemic Stroke.” *Cell Transplantation* 21(SUPPL. 1): 13–22.
- [32] Fukunaga, Atsushi et al. 1999. “Differentiation and Angiogenesis of Central Nervous System Stem Cells Implanted with Mesenchyme into Ischemic Rat Brain.” *Cell Transplantation* 8(4): 435–41.

- [33] Garzón-Muvdi, Tomás, and Alfredo Quiñones-Hinojosa. 2010. “Neural Stem Cell Niches and Homing: Recruitment and Integration into Functional Tissues.” *ILAR Journal* 51(1): 3–23.
- [34] Gelderblom, Mathias et al. 2018. “IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke.” *Stroke* 49(1): 155–64.
- [35] Gelderblom, Mathias, Priyadharshini Arunachalam, and Tim Magnus. 2014. “ $\Gamma\delta$ T Cells as Early Sensors of Tissue Damage and Mediators of Secondary Neurodegeneration.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(November): 1–5.
- [36] Grønning Hansen, Marita et al. 2020. “Grafted Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cortical Neurons Integrate into Adult Human Cortical Neural Circuitry.” *Stem Cells Translational Medicine* 9(11): 1365–77.
- [37] Gross, Cordell E., Martin M. Bednar, Diantha B. Howard, and Michael B. Sporn. 1993. “Transforming Growth Factor-B1 Reduces Infarct Size after Experimental Cerebral Ischemia in a Rabbit Model.” *Stroke* 24(4): 558–62.
- [38] Guo, Fei et al. 2012. “Bone Marrow Stromal Cells Enhance the Angiogenesis in Ischaemic Cortex after Stroke: Involvement of Notch Signalling.” *Cell Biology International* 36(11): 997–1004.
- [39] Hao, Lei et al. 2014a. “Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke.” *BioMed Research International* 2014.
- [40] ———. 2014b. “Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke.” *BioMed Research International* 2014.
- [41] Hess, David C. et al. 2017. “Safety and Efficacy of Multipotent Adult Progenitor Cells in Acute Ischaemic Stroke (MASTERS): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial.” *The Lancet Neurology* 16(5): 360–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30046-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30046-7).
- [42] Hilfiker, Andres, Cornelia Kasper, Ralf Hass, and Axel Haverich. 2011. “Mesenchymal Stem Cells and Progenitor Cells in Connective Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Is There a Future for Transplantation?” *Langenbeck's Archives of Surgery* 396(4): 489–97.
- [43] Hocum Stone, Laura L. et al. 2016. “Amelioration of Ischemic Brain Injury in Rats with Human Umbilical Cord Blood Stem Cells: Mechanisms of Action.” *Cell Transplantation* 25(8): 1473–88.
- [44] Hong, Hyenjong et al. 2009. “Suppression of iPSC Generation by the P53-P21 Pathway.” *Nature* 460(7259): 1132–35.
- [45] Honmou, Osamu et al. 2011. “Intravenous Administration of Auto Serum-Expanded Autologous Mesenchymal Stem Cells in Stroke.” *Brain* 134(6): 1790–1807.
- [46] Hori, Junko et al. 2003. “Neural Progenitor Cells Lack Immunogenicity and Resist Destruction as Allografts.” *Stem Cells* 21(4): 405–16.
- [47] Hwang, Han Sung, and Yong Sun Maeng. 2020. “Comparative Analysis of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells between Preeclampsia and Normal Pregnant Women.” *Stem Cells International* 2020.
- [48] Ichise, Hiroshi et al. 2017. “NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-

- Homozygous iPSCs.” *Stem Cell Reports* 9(3): 853–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.020>.
- [49] Iihoshi, Satoshi et al. 2004. “A Therapeutic Window for Intravenous Administration of Autologous Bone Marrow after Cerebral Ischemia in Adult Rats.” *Brain Research* 1007(1–2): 1–9.
- [50] Ilic, D, and C Ogilvie. 2016. “PLURIPOTENT STEM CELLS Concise Review : Human Embryonic Stem Cells — What Have We Done ? What Are We Doing ? Where Are We Going ?” *Stem Cells* 35(1): 17–25.
- [51] Janowski, Mirosław et al. 2014. “Long-Term MRI Cell Tracking after Intraventricular Delivery in a Patient with Global Cerebral Ischemia and Prospects for Magnetic Navigation of Stem Cells within the CSF.” *PLoS ONE* 9(6).
- [52] Jiang, Mei et al. 2011. “Induction of Pluripotent Stem Cells Transplantation Therapy for Ischemic Stroke.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 354(1–2): 67–75.
- [53] Kalladka, Dheeraj et al. 2016. “Human Neural Stem Cells in Patients with Chronic Ischaemic Stroke (PISCES): A Phase 1, First-in-Man Study.” *The Lancet* 388(10046): 787–96. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30513-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30513-X).
- [54] Kawai, Hiromi et al. 2010. “Tridermal Tumorigenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Transplanted in Ischemic Brain.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(8): 1487–93. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2010.32>.
- [55] Kelly, S. et al. 2004. “Transplanted Human Fetal Neural Stem Cells Survive, Migrate, and Differentiate in Ischemic Rat Cerebral Cortex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(32): 11839–44.
- [56] Khalil, Magdy M., Jordi L. Tremoleda, Tamer B. Bayomy, and Willy Gsell. 2011. “Molecular SPECT Imaging: An Overview.” *International Journal of Molecular Imaging* 2011: 1–15.
- [57] Kikuchi, Tetsuhiro et al. 2017. “Human IPS Cell-Derived Dopaminergic Neurons Function in a Primate Parkinson’s Disease Model.” *Nature* 548(7669): 592–96. <http://dx.doi.org/10.1038/nature23664>.
- [58] Kim, Young June, and Hal E. Broxmeyer. 2011. “Immune Regulatory Cells in Umbilical Cord Blood and Their Potential Roles in Transplantation Tolerance.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 79(2): 112–26.
- [59] Kimura, Atsushi et al. 2008. “Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells toward an Area of Brain Infarction.” *Stroke* 39(12): 3411–17.
- [60] Lalu, Manoj M. et al. 2012. “Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials.” *PLoS ONE* 7(10).
- [61] Lappalainen, Riikka S. et al. 2008. “The SPECT Imaging Shows the Accumulation of Neural Progenitor Cells into Internal Organs after Systemic Administration in Middle Cerebral Artery Occlusion Rats.” *Neuroscience Letters* 440(3): 246–50.

- [62] Lee, Hong J., Kwang S. Kim, In H. Park, and Seung U. Kim. 2007. "Human Neural Stem Cells Over-Expressing VEGF Provide Neuroprotection, Angiogenesis and Functional Recovery in Mouse Stroke Model." *PLoS ONE* 2(1).
- [63] Lee, Hong J., Mi K. Kim, Hee J. Kim, and Seung U. Kim. 2009. "Human Neural Stem Cells Genetically Modified to Overexpress Akt1 Provide Neuroprotection and Functional Improvement in Mouse Stroke Model." *PLoS ONE* 4(5).
- [64] Lee, Hong J., In J. Lim, Min C. Lee, and Seung U. Kim. 2010. "Human Neural Stem Cells Genetically Modified to Overexpress Brain-Derived Neurotrophic Factor Promote Functional Recovery and Neuroprotection in a Mouse Stroke Model." *Journal of Neuroscience Research* 88(15): 3282–94.
- [65] Lee, Soon Tae et al. 2008. "Anti-Inflammatory Mechanism of Intravascular Neural Stem Cell Transplantation in Haemorrhagic Stroke." *Brain* 131(3): 616–29.
- [66] Leu, Steve et al. 2010. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Markedly Attenuate Brain Infarct Size and Improve Neurological Function in Rats." *Journal of Translational Medicine* 8: 11–14.
- [67] Levitt, Jonathan M. et al. 2003. "Low-Dose Sulfur Mustard Primes Oxidative Function and Induces Apoptosis in Human Polymorphonuclear Leukocytes." *International Immunopharmacology* 3(5): 747–56.
- [68] Li, Jiamei et al. 2010. "Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation Protects against Cerebral Ischemic Injury and Upregulates Interleukin-10 Expression in Macaca Fascicularis." *Brain Research* 1334: 65–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.080>.
- [69] Li, Nuo Min et al. 2019. "Mutations of Beta-Amyloid Precursor Protein Alter the Consequence of Alzheimer's Disease Pathogenesis." *Neural Regeneration Research* 14(4): 658–65.
- [70] Li, Tong et al. 2016. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) from an Alzheimer's Disease Patient Carrying a M146I Mutation in PSEN1." *Stem cell research* 16(2): 334–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.01.001>.
- [71] Li, Xueyuan et al. 2016. "Human Neural Stem Cell Transplantation Rescues Cognitive Defects in APP/PS1 Model of Alzheimer's Disease by Enhancing Neuronal Connectivity and Metabolic Activity." *Frontiers in Aging Neuroscience* 8(NOV): 1–14.
- [72] Li, Y. et al. 2001. "Treatment of Stroke in Rat with Intracarotid Administration of Marrow Stromal Cells." *Neurology* 56(12): 1666–72.
- [73] Li, Yi et al. 2005. "Gliosis and Brain Remodeling after Treatment of Stroke in Rats with Marrow Stromal Cells." *Glia* 49(3): 407–17.
- [74] Liesz, Arthur et al. 2009. "Regulatory T Cells Are Key Cerebroprotective Immunomodulators in Acute Experimental Stroke." *Nature Medicine* 15(2): 192–99.
- [75] Linaro, Daniele et al. 2019. "Xenotransplanted Human Cortical Neurons Reveal Species-Specific Development and Functional Integration into Mouse Visual Circuits." *Neuron* 104(5): 972-986.e6.

- [76] Liu, Xuebin et al. 2017. “Comparative Analysis of Curative Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Spastic Cerebral Palsy.” *Journal of Translational Medicine* 15(1): 1–9.
- [77] Maida, Carlo Domenico et al. 2020. “Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(18): 1–33.
- [78] Malchenko, Sergey et al. 2014. “Onset of Rosette Formation during Spontaneous Neural Differentiation of HESC and HiPSC Colonies.” *Gene* 534(2): 400–407. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.101>.
- [79] Matthew R. Chrostek,^a Emily G. Fellows,^a Andrew T. Crane,^a Andrew W. Grande,^{a,b} and Walter C. Lowa,^{b, *}. 2019. “Efficacy of Stem Cell-Based Therapies for Stroke.”
- [80] Merkle, Florian T. et al. 2017. “Human Pluripotent Stem Cells Recurrently Acquire and Expand Dominant Negative P53 Mutations.” *Nature* 545(7653): 229–33.
- [81] Michael W. Irvin, Andries Zijlstra, John P. Wikswo and Ambra Pozz. 2014. “基因的改变 NIH Public Access.” *Exp Biol Med* 239(11): 1476–88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- [82] Ming, Guo li, and Hongjun Song. 2011. “Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions.” *Neuron* 70(4): 687–702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>.
- [83] Murakami, Yuki et al. 2005. “Increases in Tumor Necrosis Factor- α Following Transient Global Cerebral Ischemia Do Not Contribute to Neuron Death in Mouse Hippocampus.” *Journal of Neurochemistry* 93(6): 1616–22.
- [84] Nakamura, Masaya, and Hideyuki Okano. 2013. “Cell Transplantation Therapies for Spinal Cord Injury Focusing on Induced Pluripotent Stem Cells.” *Cell Research* 23(1): 70–80. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2012.171>.
- [85] Nakazaki, Masahito et al. 2019. “Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Improves Impaired Cognitive Function in a Cerebral Small Vessel Disease Model.” *Neuroscience* 408: 361–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.018>.
- [86] Nito, Chikako et al. 2018. “Transplantation of Human Dental Pulp Stem Cells Ameliorates Brain Damage Following Acute Cerebral Ischemia.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 108(April): 1005–14. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.084>.
- [87] O’Garra, Anne, Pedro L. Vieira, Paulo Vieira, and Anne E. Goldfeld. 2004. “IL-10–Producing and Naturally Occurring CD4⁺ Tregs: Limiting Collateral Damage.” *Journal of Clinical Investigation* 114(10): 1372–78.
- [88] Ota, Ken Ichiro. 2008. “Fuel Cells: Past, Present and Future.” *IEEE Transactions on Fundamentals and Materials* 128(5): 329–32.
- [89] Oyamada, Naofumi et al. 2008. “Transplantation of Vascular Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Contributes to Vascular Regeneration after Stroke in Mice.” *Journal of Translational Medicine* 6: 1–14.
- [90] Palma-Tortosa, Sara et al. 2020. “Activity in Grafted Human IPS Cell–Derived Cortical Neurons Integrated in Stroke-Injured Rat Brain Regulates Motor

- Behavior.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(16): 9094–9100.
- [91] Palma-Tortosa, Sara, Berta Coll-San Martin, Zaal Kokaia, and Daniel Tornero. 2021. “Neuronal Replacement in Stem Cell Therapy for Stroke: Filling the Gap.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(April): 1–7.
- [92] Pereira, Inês M., Ana Marote, António J. Salgado, and Nuno A. Silva. 2019. “Filling the Gap: Neural Stem Cells as a Promising Therapy for Spinal Cord Injury.” *Pharmaceuticals* 12(2): 1–32.
- [93] Piao1, Jinghua. 2021. “Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01.” *Cell Stem Cell*.
- [94] Pollock, Kenneth et al. 2006. “A Conditionally Immortal Clonal Stem Cell Line from Human Cortical Neuroepithelium for the Treatment of Ischemic Stroke.” *Experimental Neurology* 199(1): 143–55.
- [95] Ponnaiyan, Deepa, and Visakan Jegadeesan. 2014. “Comparison of Phenotype and Differentiation Marker Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.” *European Journal of Dentistry* 8(3): 307–13.
- [96] Protosaltis, John et al. 2009. “Prediction of Long-Term Functional Outcome in Patients with Acute Ischemic Non-Embolic Stroke.” *Atherosclerosis* 203(1): 228–35.
- [97] Qu, Runjiang et al. 2007. “Neurotrophic and Growth Factor Gene Expression Profiling of Mouse Bone Marrow Stromal Cells Induced by Ischemic Brain Extracts.” *Neuropathology* 27(4): 355–63.
- [98] Rayasam, Aditya et al. 2018. “Immune Responses in Stroke: How the Immune System Contributes to Damage and Healing after Stroke and How This Knowledge Could Be Translated to Better Cures?” *Immunology* 154(3): 363–76.
- [99] Rietdijk, Carmen D, Richard J A Van Wezel, Johan Garssen, and Aletta D Kraneveld. 2022. “Neuronal Toll-like Receptors and Neuro-Immunity in Parkinson ’ s Disease , Alzheimer ’ s Disease and Stroke.”
- [100] Rudelius, Martina et al. 2003. “Highly Efficient Paramagnetic Labelling of Embryonic and Neuronal Stem Cells.” *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30(7): 1038–44.
- [101] Sacco, Ralph L. et al. 2013. “An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association.” *Stroke* 44(7): 2064–89.
- [102] Sakaguchi, Shimon, and Noriko Sakaguchi. 2005. “Regulatory T Cells in Immunologic Self-Tolerance and Autoimmune Disease.” *International Reviews of Immunology* 24(3–4): 211–26.
- [103] Sakata, Hiroyuki et al. 2012. “Interleukin 6-Preconditioned Neural Stem Cells Reduce Ischaemic Injury in Stroke Mice.” *Brain* 135(11): 3298–3310.
- [104] Savitz, Sean I. et al. 2019. 139 *Circulation A Phase 2 Randomized, Sham-Controlled Trial of Internal Carotid Artery Infusion of Autologous Bone Marrow-Derived ALD-401 Cells in Patients With Recent Stable Ischemic Stroke (RECOVER-Stroke)*.

- [105] Schilling, Matthias et al. 2005. “Predominant Phagocytic Activity of Resident Microglia over Hematogenous Macrophages Following Transient Focal Cerebral Ischemia: An Investigation Using Green Fluorescent Protein Transgenic Bone Marrow Chimeric Mice.” *Experimental Neurology* 196(2): 290–97.
- [106] Shen, Li Hong et al. 2007. “One-Year Follow-up after Bone Marrow Stromal Cell Treatment in Middle-Aged Female Rats with Stroke.” *Stroke* 38(7): 2150–56.
- [107] Shiao, Maple L. et al. 2019. “Immunomodulation with Human Umbilical Cord Blood Stem Cells Ameliorates Ischemic Brain Injury – A Brain Transcriptome Profiling Analysis.” *Cell Transplantation* 28(7): 864–73.
- [108] Smith, Edward J. et al. 2012. “Implantation Site and Lesion Topology Determine Efficacy of a Human Neural Stem Cell Line in a Rat Model of Chronic Stroke.” *Stem Cells* 30(4): 785–96.
- [109] Sondka, Zbyslaw et al. 2018. “The COSMIC Cancer Gene Census: Describing Genetic Dysfunction across All Human Cancers.” *Nature Reviews Cancer* 18(11): 696–705.
- [110] Song, Miyeoun et al. 2017. “Human Dental Pulp Stem Cells Are More Effective than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury.” *Cell Transplantation* 26(6): 1001–16.
- [111] Suda, Satoshi et al. 2020. “Recent Advances in Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(18): 1–24.
- [112] Suzuki, Shigeaki, Kortaro Tanaka, and Norihiro Suzuki. 2009. “Ambivalent Aspects of Interleukin-6 in Cerebral Ischemia: Inflammatory versus Neurotrophic Aspects.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29(3): 464–79.
- [113] Syková, Eva. 2001. “Glial Diffusion Barriers during Aging and Pathological States.” *Progress in Brain Research* 132: 339–63.
- [114] Takahashi, Jun. 2020. “IPS Cell-Based Therapy for Parkinson’s Disease: A Kyoto Trial.” *Regenerative Therapy* 13: 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.06.002>.
- [115] Takahashi, Kazuya et al. 2008. “Embryonic Neural Stem Cells Transplanted in Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Rats Demonstrated Potent Therapeutic Effects, Compared to Adult Neural Stem Cells.” *Brain Research* 1234: 172–82.
- [116] Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2013. “Induced Pluripotent Stem Cells in Medicine and Biology.” *Development (Cambridge)* 140(12): 2457–61.
- [117] Tat, Pollyanna A. et al. 2010. “The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells from Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells.” *Cell Transplantation* 19(5): 525–36.
- [118] Taylor, Craig J. et al. 2005. “Banking on Human Embryonic Stem Cells: Estimating the Number of Donor Cell Lines Needed for HLA Matching.” *Lancet* 366(9502): 2019–25.
- [119] Theunissen, Thorold W. et al. 2014. “Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency.” *Cell Stem Cell* 15(4): 471–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.002>.

- [120] Thompson, Jesse E. 1996. "The Evolution of Surgery for the Treatment and Prevention of Stroke: The Willis Lecture." *Stroke* 27(8): 1427–34.
- [121] Thored, Pär et al. 2006. "Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke." *Stem Cells* 24(3): 739–47.
- [122] Tobin, Matthew K. et al. 2020. "Activated Mesenchymal Stem Cells Induce Recovery Following Stroke via Regulation of Inflammation and Oligodendrogenesis." *Journal of the American Heart Association* 9(7).
- [123] Tornero, Daniel et al. 2017. "Synaptic Inputs from Stroke-Injured Brain to Grafted Human Stem Cell-Derived Neurons Activated by Sensory Stimuli." *Brain* 140(3): 692–706.
- [124] Toyoshima, Atsuhiko et al. 2015. "Intra-Arterial Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Mounts Neuroprotective Effects in a Transient Ischemic Stroke Model in Rats: Analyses of Therapeutic Time Window and Its Mechanisms." *PLoS ONE* 10(6): 1–17.
- [125] Turner, Nicholas, and Richard Grose. 2010. "Fibroblast Growth Factor Signalling: From Development to Cancer." *Nature Reviews Cancer* 10(2): 116–29. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2780>.
- [126] Uchida, Kohichi, Michael D. Kawaja, Shigeo Toya, and Arthur H. Roach. 1995. "Transgenic Neural Plate Contributes Neuronal Cells That Survive Greater than One Year When Transplanted into the Adult Mouse Central Nervous System." *Experimental Neurology* 132(2): 194–208.
- [127] Ukai, Ryo et al. 2007. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Protects against Ischemia." *Journal of Neurotrauma* 24(3): 508–20.
- [128] de Vasconcelos dos Santos, Andréia et al. 2010. "Therapeutic Window for Treatment of Cortical Ischemia with Bone Marrow-Derived Cells in Rats." *Brain Research* 1306: 149–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.094>.
- [129] Vendrame, Martina et al. 2004. "Infusion of Human Umbilical Cord Blood Cells in a Rat Model of Stroke Dose-Dependently Rescues Behavioral Deficits and Reduces Infarct Volume." *Stroke* 35(10): 2390–95.
- [130] Vogel, Stefanie et al. 2019. "The in Vivo Timeline of Differentiation of Engrafted Human Neural Progenitor Cells." *Stem Cell Research* 37(January): 101429. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101429>.
- [131] Wang, Lei et al. 2004. "Treatment of Stroke with Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats." *Stroke* 35(7): 1732–37.
- [132] Ward, R. J., S. Wilmet, R. Legssyer, and R. R. Crichton. 2002. "The Influence of Iron Homeostasis on Macrophage Function." *Biochemical Society Transactions* 30(4): 762–65.
- [133] Wei, Ling et al. 2005. "Transplantation of Embryonic Stem Cells Overexpressing Bcl-2 Promotes Functional Recovery after Transient Cerebral Ischemia." *Neurobiology of Disease* 19(1–2): 183–93.
- [134] Wilson, Patricia G., and Steve S. Stice. 2006. "Development and Differentiation of Neural Rosettes Derived from Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cell Reviews* 2(1): 67–77.

- [135] Xiao, Jing, Zhenhong Nan, Yasuhiko Motooka, and Walter C. Low. 2005. "Transplantation of a Novel Cell Line Population of Umbilical Cord Blood Stem Cells Ameliorates Neurological Deficits Associated with Ischemic Brain Injury." *Stem Cells and Development* 14(6): 722–33.
- [136] Xin, Hongqi et al. 2010. "Increasing TPa Activity in Astrocytes Induced by Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Facilitate Neurite Outgrowth after Stroke in the Mouse." *PLoS ONE* 5(2).
- [137] Xiong, Liu Lin et al. 2018. "Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery from Traumatic Brain Injury via Brain Derived Neurotrophic Factor-Mediated Neuroplasticity." *Molecular Neurobiology* 55(3): 2696–2711.
- [138] Yamanaka, Shinya. 2020. "Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges." *Cell Stem Cell* 27(4): 523–31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>.
- [139] Yanagisawa, Daijiro et al. 2006. "Improvement of Focal Ischemia-Induced Rat Dopaminergic Dysfunction by Striatal Transplantation of Mouse Embryonic Stem Cells." *Neuroscience Letters* 407(1): 74–79.
- [140] Yin, Lan et al. 2008. "Expression and Regulation of Major Histocompatibility Complex on Neural Stem Cells and Their Lineages." *Stem Cells and Development* 17(1): 53–65.
- [141] Yoo, Seung Wan et al. 2013. "Immune Following Suppression Mesenchymal Stem Cell Transplantation in the Ischemic Brain Is Mediated by TGF- β ." *Neurobiology of Disease* 58: 249–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.001>.
- [142] Yu, Shan Ping et al. 2019. "Optochemogenetic Stimulation of Transplanted Ips-Npcs Enhances Neuronal Repair and Functional Recovery after Ischemic Stroke." *Journal of Neuroscience* 39(33): 6571–94.
- [143] Zhang, Fu Qiang et al. 2020. "Current Status and Future Prospects of Stem Cell Therapy in Alzheimer's Disease." *Neural Regeneration Research* 15(2): 242–50.
- [144] Zhao, Tongbiao, Zhen Ning Zhang, Zhili Rong, and Yang Xu. 2011. "Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 474(7350): 212–16.
- [145] Zhao, Ming Zhu et al. 2006. "Novel Therapeutic Strategy for Stroke in Rats by Bone Marrow Stromal Cells and Ex Vivo HGF Gene Transfer with HSV-1 Vector." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26(9): 1176–88.