

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (EPCs) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Γ. ΧΑΝΤΖΗΧΡΗΣΤΟΣ Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)».

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 794^A/14-05-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

κ. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων Μέλη:

κ. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

κ. Ιωάννης Γουδέβενος, Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 04-06-2010

Θέμα: «Μελέτη του ρόλου των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) στην αθηρωματική νόσο».

<u>ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:</u> 884^A/30-05-2014

- κ. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
- 2. κ. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
- κ. Ιωάννης Γουδέβενος, Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
- 4. κ. Εμμανουήλ Παπαμιχαήλ, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
- κ. Μηνά Πασχόπουλο, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
- 6. κα. Άννα Ειρήνη Κούκκου, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
- κ. Χαράλαμπος Μηλιώνης, Αν. Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 02-07-2014

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια Η Γραμματέας του Τμήματος Ελένη Αδαμαντίου

Στην οικογένεια μου

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών) του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Μάϊο του 2010 έως τον Ιούνιο του 2014.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, ο οποίος μου ανέθεσε το θέμα της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής προσπαθώντας να μου μεταδώσει τις γνώσεις του και να με βοηθήσει στις δυσκολίες που προέκυπταν. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συμμετοχή μου σε ερευνητικά προγράμματα και την οικονομική ενίσχυση όποτε αυτό ήταν δυνατό και την καθοριστικής σημασίας συμβολής του όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και τον κ. Ιωάννη Γουδέβενο, Καθηγητή Καρδιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μηνά Πασχόπουλο και την ειδικευόμενη ιατρό κ. Φανή Γκρόζου για τον πολύ καλό συντονισμό που υπήρξε στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη για την άψογη συνεργασία μας κατά την συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Ρέα Ντότη αλλά και σε όλους τους συνεργάτες του στο εξωτερικό ιατρείο λιπιδίων αλλά και τους ειδικευομένους της Β΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την εξαίρετη συνεργασία μας στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Επίσης, ευχαριστώ πολύ και τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής κ. Εμμανουήλ Παπαμιχαήλ, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κ. Άννα Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στην Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης, η οποία μου χορήγησε υποτροφία ύψους 3000€ για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τον Επίκουρο καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Σάββα Χριστοφορίδη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών στα Ιωάννινα και τη μεταδιδακτορική του ερευνήτρια κ. Σοφία Ζωγράφου για την πολύτιμη παροχή των ενδοθηλιακών κυττάρων, τις συμβουλές τους, όπως επίσης και για τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα κ. Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα για τις συμβουλές και τις υποδείξεις της σχετικά με την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά τη διδάκτορα κ. Μαρία Πετράκη, τον άνθρωπο που με καθοδήγησε στις μεθοδολογίες των κυττάρων στα πρώτα μου βήματα, τη διδάκτορα κ. Ανδρομάχη Δημητρίου για τη σημαντική βοήθεια της στο χώρο των αιμοπεταλίων και του κυτταρομέτρου ροής, όπως επίσης και την υποψήφια διδάκτορα κ. Αλεξία Γκουρογιάννη για τη σημαντική βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ την Κατερίνα Γατσιού και Προκοπία Τατσίδου για τη βοήθειά τους όποτε υπήρχε ανάγκη. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους συνεργάτες μου Παναγιώτη Κουσιάππα, Χρυστάλλα Κουμπαρή, Κλεοπάτρα Ρουσούλη, Μαρία Τσουμάνη και Ηρακλή Μοσχονά για την στήριξη και το ωραίο κλίμα που υπήρχε κατά την διάρκεια της διατριβής. του και την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους φίλους μου που τόσο καιρό με υποστήριζαν και με εμψύχωναν στις δυσκολίες που τυχόν αντιμετώπιζα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους γονείς μου Γιώργο και Δέσποινα καθώς και στην αδερφή μου Έλενα για τη βοήθεια, τη στήριξη, την αμέριστη συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές και την αγάπη τους. Η στήριξή τους ήταν καταλυτική στην προσπάθεια ολοκλήρωσης της εργασίας μου. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου. Ελπίζω αυτή η διατριβή να ανταμείψει τους κόπους τους.

ii

Συντμήσεις

AA	Αραχιδονικό οξύ				
AC	Αδενυλική κυκλάση				
AcLDL	Ακετυλιωμένη LDL				
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη				
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη				
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη				
BM	Μυελός των οστών				
BOECs	Προχωρημένης ωρίμανσης EPCs που προέρχονται από το αίμα				
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοδιού				
CACs	Κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα				
CAD	Στεφανιαία νόσος				
cAMP	Κυκλικό 3΄5΄-αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ				
СВ	Αίμα ομφάλιου λώρου				
CB-MNCs	Μονοπύρηνα κύτταρα αίματος από ομφάλιο λώρο				
CD3	Αντιγόνο των λεμφοκυττάρων				
CD11	Αντιγόνο των μακροφάγων				
CD31 ή	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών				
PECAM-1	κυττάρων				
CD34	Αντιγόνο των πρόδρομων κυττάρων				
CD36	Υποδοχέας εκκαθαριστής				
CD40L	Προσδέτης του CD40				
CD45	Αντιγόνο των λευκοκυττάρων				
CD54	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1				
CD61	β_3 υπομονάδα του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$				
CD62P	Ρ-σελεκτίνη				
CD105	Ενδογλίνη				
CD106	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1				
CD115	Αντιγόνο των μονοκυττάρων/μακροφάγων				
CD144	Αγγειακή ενδοθηλιακή καδερίνη				
CD146	Προσκολλητικό μόριο κυττάρων μελανώματος				
CECs	Κυκλοφορούντα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα				
CFU-Hill ή	Μονάδες σχηματισμού αποικιών				
CFUs					
cGMP	Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη				
COX-1	Κυκλοοξυγονάση-1				
CVD	Καρδιαγγειακή νόσος				
CXCR4	Υποδοχέας 4 των χημειοκινών CXC				
DAG	Διακυλογλυκερόλη				
dH ₂ O	$Aπιονισμένο H_2O$				
Dil	1,1'-διοκταδέκυλ-3,3,3',3'-τετραμέθυλ-ινδοκαρβοκυάνινο υπερχλωρικ				
DMSO	Διμεθυλοσουλφοζείδιο				
dKP DTG	Φωσφορική δεοξυριβόζη				
	Πυκνο σωληνοειοες συστημα				
Early EPCs	Πρωιμα προδρομα ενδοθηλιακα κυτταρα				
EBM-2	Βασικο (η κυριο) θρεπτικο μεσο των ενδοθηλιακών κυττάρων				

ECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα			
ECFCs	Κύτταρα με ικανότητα να σχηματίζουν ενδοθηλιακές αποικίες			
ECGS	Αυξητικό συμπλήρωμα των ενδοθηλιακών κυττάρων			
ECM	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία			
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ			
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας			
ELISA	Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική τεχνική			
EMPs	Ενδοθηλιακά μικροσωματίδια			
ENA-78	Επιθηλιακή ουδετερόφιλη-ενεργοποιητική πρωτεΐνη-78			
eNOS	Ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου			
EPCs	Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα			
FBS	Ορός εμβρύου βοδιού			
FC	Κυτταρομετρία ροής			
FCS	Ορός εμβρύου μόσχου			
Fg	Ινωδογόνο			
FITC	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη			
FSC	Πρόσθια σκέδαση			
GA-1000	Γενταμυκίνη, Αμφοτερικίνη Β			
G-SCF	Παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων			
hEGF	Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας			
hEPCs	Αιμοποιητικής προέλευσης EPCs			
hFGF-B	Αυξητικός παράγοντας-Β των ανθρώπινων ινοβλαστών			
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη			
HPCs	Αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα			
HSCs	Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα			
HUVECs	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου			
ICAM-1	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1			
ICAMs	Μόρια της διακυτταρικής προσκόλλησης			
IL-1	Ιντερλευκίνη-1			
IL-8	Ιντερλευκίνη-8			
IP ₃	Τριφωσφορική ινοσιτόλη			
JAMs	Συνενωτικά μόρια προσκόλλησης			
KDa	Κιλό Dalton - Μονάδα μοριακής μάζας x 10 ³			
KDR	Υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης			
K ₂ EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό κάλιο			
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη			
MACS	Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων			
MAPCs	Πολυδύναμα ενήλικα πρόδρομα κύτταρα			
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων			
MFI	Μέση ένταση φθορισμού			
MIP-1	Φλεγμονώδης πρωτεΐνη-1α των μακροφάγων			
MKs	Μεγακαρυοκύτταρα			
MMP-9	Μεταλλοπρωτεϊνάση-9			
MNCs	Μονοπύρηνα κύτταρα			
MPs	Μικροσωματίδια			
MPV	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων			
MS	Μαγνητικός διαχωρισμός			
NF-kB	Πυρηνικός παράγοντας-κΒ			
NO	Μονοξείδιο του αζώτου			

Non-hEPCs	Μη αιμοποιητικής προέλευσης EPCs			
OCS	Ανοιχτό πολυκάναλο σύστημα			
OECs	Προχωρημένης ωρίμανσης ËPCs			
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων			
PAF-AH	Ακετυλοϋδρολάση του ΡΑΓ			
PARs	Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες			
PB	Περιφερικό αίμα			
PB-MNCs	Μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος			
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών			
PDGF	Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας			
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη			
PF-4	Αιμοπεταλιακός παράγοντας-4			
PGE ₁	Προσταγλανδίνη Ε1			
PGI ₂	Προσταγλανδίνη I_2			
PI	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη			
PIP ₂	4,5-δισφωσφορική-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη			
PLC	Φωσφολιπάση C			
PMPs	Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων			
PPP	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια			
PRP	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια			
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη			
PSLG-1	Γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της Ρ-σελεκτίνης			
РТК	Πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης			
RANTES	Ρυθμιζόμενη μετά από ενεργοποίηση κανονικών Τ κυττάρων που			
	εκφράζεται και εκκρίνεται			
R3-IGF-1	Αυξητικός παράγοντας R3 που είναι παρόμοιος με την ινσουλίνη			
SM	Σφιγγομυελίνη			
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα			
SSC	Πλάγια σκέδαση			
TF	Ιστικος παραγοντας			
TG	Ιριγλυκεριδια			
TGF-β	Μετασχηματιστικός αυζητικός παραγοντάς-β			
	Υποσοχείς τυπου ΙοΙΙ			
INF-α	Παραγοντας νεκρωσης του ογκων-α			
	Φωσφορυλαση της θυμιοινης			
t-PA TDO	Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου			
	$\Theta_{\text{poppoword}}$			
TS	$\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2} \sum_{i$			
TSD	Ωοομβοσπονδίνη			
	Θρομβοξάνιο Δο			
VCAM-1	σμομροςανιο Α2 Προσκολλητικό μόριο του ανασιακού τοινώματος 1			
VEGE	Προσκολητικό μοριο του αγγειακού τοιχωματος-1 Δυνειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγουτας			
VEGFR-	Αγγειακός ενουσηλιακός αυζητικός παραγόντας			
2/KDR	Υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα/KDR			
VHDL	Πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες			
VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες			
vWF	Παράγοντας von Willebrand			
5-HT	Σεροτονίνη ή 5-υδροξυτρυπταμίνη			

Σκοπός της Διατριβής

Είναι γνωστό ότι, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αιμόσταση, στη φλεγμονή και στην αγγειογένεση. Μελέτες τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs) συνεισφέρουν σε σημαντικό βαθμό στην αναγέννηση του αγγειακού ενδοθηλίου και στην επανενδοθηλιοποίηση. Τα EPCs ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, τα Colony forming unit-Hill (CFU-Hill) κύτταρα και τα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs) που είναι τα πρώιμα EPCs (early EPCs), καθώς και τα προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs, ECFCs ή late EPCs). Τέλος, είναι γνωστό ότι ο ομφάλιος λώρος είναι εμπλουτισμένος σε CD34⁺ κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε OECs.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι αρχικά η ανάπτυξη μεθόδων καλλιέργειας των EPCs για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας και ο χαρακτηρισμός τους. Στη συνέχεια, θα γίνει η επίδραση των διαφόρων κατηγοριών των EPCs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, *in vitro* με τις τεχνικές της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας και κυτταρομετρίας ροής. Τέλος, θα γίνει η επίδραση των CD34⁺ κυττάρων και των HUVECs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος - Ευχαριστίες	i
Συντμήσεις	iii
Σκοπός της Διατριβής	vii
Περιεχόμενα	ix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°	1
Αιμοπετάλια	1
Δομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων	1
Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους	10
Προσκόλληση των αιμοπεταλίων	23
Συσσώρευση των αιμοπεταλίων και σχηματισμός θρόμβου	24
Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs)	27
Ορισμός	27
Γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2[°]	30
Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs)	30
Εισαγωγή	30
Διαφορά μεταξύ βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων	32
Ορισμός και προέλευση των EPCs	34
Φαινότυπος των EPCs	37
Ταυτοποίηση των EPCs	41
Σύγκριση OECs από PB και CB	58
EPCs και Αθηροσκλήρωση	59
Ο ρόλος των EPCs στην αναγέννηση του ενδοθηλίου	62
Ορισμός επαναγγείωσης	62
Συνεισφορά των early και late EPCs στην αγγειακή επιδιόρθωση και νεοαγγειογένεση	65

Απόπτωση και αναγέννηση των ECs	67
---------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3º	
Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με τα ECs και EPCs	
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση	
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs)	74 78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°	82
Υλικά – Μέθοδοι	82
Μελέτη της έκφρασης των CD45, CD34 και KDR στο ολικό αίμα	82
Απομόνωση και καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος	85
Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων και διαφοροποίηση προς colony forming unit-Hill (CFU-Hill) κύτταρα	89
Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων και διαφοροποίηση προς κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs)	91
Απομόνωση των CD34 ⁺ κυττάρων από αίμα από ομφάλιο λώρο	92
Μέθοδος μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού (MACS)	92
Περιγραφή των υλικών και των συσκευών που χρησιμοποιούνται στο μαγνητικό διαχωρισμό Καλλιέργεια των CD34 ⁺ κυττάρων και διαφοροποίηση τους προς	
Αποιιόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώοο (HUVECs)	115
Καλλιέονεια των ΗUVECs	118
Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των EPCs, των CD34 ⁺ και των HUVECs κυττάρων	121
Παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων	132
Μελέτη της επίδρασης των CD34 ⁺ , των EPCs και των HUVECs κυττάρων, καθώς και των υπερκειμένων τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων	137
Παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP)	
Μελέτη της επίδρασης των CD34 ⁺ (κυττάρων), OECs και HUVECs (κυττάρων και υπερκειμένων τους) στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων	145

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 [°]	150
Αποτελέσματα	150
Α. Ανίχνευση των EPCs στο ολικό αίμα	150
Β. Χαρακτηρισμός των απομονωμένων κυτταρικών πληθυσμών EPCs	153
Συγκριτική αξιολόγηση των χαρακτηριστικών των τριών κυτταρικών πληθυσμών	175
Γ. Επίδραση των κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων	175
Δ. Επισραση των κυτταρων και του υπερκειμενού τους στην ενεργοποιηση των αιμοπεταλίων	194
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°	211
Συζήτηση	211
Χαρακτηρισμός των διαφόρων κατηγοριών των EPCs	213
Επίδραση των διαφόρων τύπων των EPCs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με συσσωρευομετρία Επίδραση των OECs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής	220 223
ПЕРІЛНΨН	226
ABSTRACT	230
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	233
ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	268

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1[°]

Αιμοπετάλια

Δομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα σε μέγεθος κύτταρα του αίματος και αποτελούν το 0,5% του όγκου του αίματος. Το μέγεθος όπως και η πυκνότητά τους ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Αρχικά, τα αιμοπετάλια αναφέρονταν ως κυτταρική σκόνη. Στη συνέχεια όμως ανακαλύφθηκε, ότι τα αιμοπετάλια είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή διαφόρων διαδικασιών, όπως την αιμόσταση, την επούλωση τραυμάτων, την αγγειογένεση, τη φλεγμονή και την επίκτητη ανοσία. Παράγονται στο μυελό των οστών (BM) από τον θρυμματισμό του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων (MKs) και γι' αυτό τον λόγο είναι απύρηνα κύτταρα. Λόγω της έλλειψης πυρήνα, τα αιμοπετάλια έχουν ελάχιστη ικανότητα για σύνθεση πρωτεϊνών. Παρόλο που είναι απύρηνα κύτταρα, περιέχουν στο κυτταρόπλασμα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ριβοσώματα, mRNA διαφόρων πρωτεϊνών, κυτταροσκελετό, καθώς και πολυάριθμα κοκκία που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου και τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια περιέχουν στο εσωτερικό τους ένα πολύπλοκο μεμβρανικό σωληνοειδές σύστημα το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, έχουν ελάχιστα στοιχεία της συσκευής Golgi καθώς και υπολείμματα του πυκνού ενδοπλασματικού δικτύου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κάθε ΜΚ δίνει 2x10¹¹ αιμοπετάλια καθημερινά. Οι φυσιολογικές τιμές των αιμοπεταλίων κυμαίνονται από 150.000-400.000/mm³ (μl). Επιπλέον, έχουν διάμετρο 1-3 μm και μέσο όγκο (MPV) 8-12 fl, όπου MPV είναι ένας σημαντικός δείκτης του όγκου των αιμοπεταλίων και αξιολόγησης αιματολογικών και αιμορραγικών διαταραχών. Η διάρκεια ζωής τους στο αίμα είναι 7-10 μέρες και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται στα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα [1-5].

Σχετικά με τη διαδικασία παραγωγής των αιμοπεταλίων, αυτή πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.1. Αρχικά, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) που βρίσκονται στον BM ενός ενηλίκου διαφοροποιούνται σε MKs σε

απόκριση προς τη θρομβοποιητίνη (TPO). Η TPO είναι η καθοριστική πρωτεΐνη που ελέγχει την ανάπτυξη των MKs. Εκτός της TPO, σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν επίσης πολλές ορμόνες και κυτοκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες 3, 6 και 11 [1, 6]. Τα MKs είναι τα μεγαλύτερα (50-100 μm) και επίσης από τα πιο σπάνια κύτταρα στον BM [4, 7]. Στη συνέχεια, τα MKs γίνονται πολυπλοειδή μέσω της ενδομίτωσης η οποία είναι η διαδικασία της αντιγραφής του DNA χωρίς όμως να γίνει κυτταρική διαίρεση. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο αναπτύσσεται ένας πυρήνας που ποικίλλει ως προς το περιεχόμενο του DNA από 2 ως 128 νουκλεοτίδια.



Εικόνα 1.1: Διαδικασία παραγωγής των αιμοπεταλίων.

Αιμοπετάλια

Καθώς τα MKs ωριμάζουν, αυτά αναπτύσσουν μια μεμβράνη διαμέσου του κυτταροπλάσματός τους, η οποία είναι συνεχής με την εξωτερική πλασματική μεμβράνη. Η συγκεκριμένη μεμβράνη χρησιμεύει ως αποθήκη για το σχηματισμό των πρόδρομων αιμοπεταλίων (proplatelets). Από ένα MK μπορεί να προκύψουν 10-20 πρόδρομα αιμοπετάλια. Τελικά, από τα 10-20 πρόδρομα αιμοπετάλια μπορούν να προκύψουν στη συνέχεια 2000-5000 αιμοπετάλια. Καθώς τα αιμοπετάλια αναπτύσσονται, λαμβάνουν το περιεχόμενο των κοκκίων και των οργανιδίων τους ως τμήματα μεμονωμένων σωματιδίων, τα οποία μεταφέρονται από τα MKs [1, 4, 8, 9].

Σε κατάσταση ηρεμίας, τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα το οποίο υποστηρίζεται από τα μικρονημάτια που βρίσκονται στην επιφάνειά τους, η οποία δεν υπερβαίνει τα 8 μ m² (Εικόνα 1.2A). Κατά την ενεργοποίησή τους όμως αλλάζουν σχήμα και διαμόρφωση αποκτώντας ψευδοπόδια (Εικόνα 1.2B), τα οποία αποτελούν προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, η επιφάνεια των αιμοπεταλίων αυξάνεται μέγρι και τα 13 μm² [10] και απελευθερώνουν το περιεγόμενο των κοκκίων τους μέσω του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Τέλος, στην εικόνα 1.2Γ απεικονίζονται τα αιμοπετάλια ενώ βρίσκονται σε κατάσταση απόπτωσης. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η θρομβίνη, η επινεφρίνη, το θρομβοξάνιο A2 (TxA2), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), το κολλαγόνο και το πεπτίδιο-14 ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης (Trap14) που είναι ανάλογο της θρομβίνης. Οι αγωνιστές αυτοί ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια διαμέσου ειδικών υποδοχέων με αποτέλεσμα τη διέγερση διαφόρων ενδοκυττάριων μεταβολικών οδών, την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, την αποκοκκίωση καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέαιντεγκρίνης α_{Πb}β₃. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο ή στον υπενδοθηλιακό χώρο.

Κατά την κυκλοφορία τους, τα αιμοπετάλια έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια της αιματικής ροής και έτσι έχουν την ικανότητα να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν γρήγορα σε οποιαδήποτε βλάβη του ενδοθηλίου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η συσσώρευση η οποία γίνεται διαμέσου γεφυρών ινωδογόνου (Fg) παρουσία ιόντων Ca²⁺. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συσσωματώματα μεταξύ των αιμοπεταλίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμόστασης και της πήξης του αίματος.

Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε διάφορες άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή και η αθηροσκλήρωση [11, 12].



Εικόνα 1.2: Χαρακτηριστικό σχήμα αιμοπεταλίων σε ηρεμία (**A**), μετά από ενεργοποίηση (**B**) και σε κατάσταση απόπτωσης (**Γ**).

Το αιμοπετάλιο μπορεί να διαχωριστεί δομικά σε τέσσερις μορφολογικά διακριτές περιοχές: **α**) την περιφερική ζώνη, **β**) τη δομική ζώνη, γ) τη ζώνη των οργανιδίων και **δ**) τη ζώνη του μεμβρανικού συστήματος (Εικόνα 1.3) [3, 11, 12].



Εικόνα 1.3: Το δισκοειδές σχήμα του αιμοπεταλίου και τα διάφορα συστατικά του.

Αιμοπετάλια

α) Περιφερική ζώνη: Είναι υπεύθυνη για τις διαδικασίες της προσκόλλησης και της συσσώρευσης. Αποτελείται από τον γλυκοκάλυκα και την κυτταρική μεμβράνη. Η συγκεκριμένη διακριτή περιοχή μπορεί να περιέχει τους παράγοντες πήξης Ι, V, VIII, XI και XII καθώς και υποδοχείς για το ADP, τη θρομβίνη, τον παράγοντα von Willebrand (vWF), το κολλαγόνο, το Fg, το ινώδες, τη φιβρονεκτίνη, την επινεφρίνη, τον PAF, τη θρομβοσπονδίνη (TSP), το TXA₂, την προστακυκλίνη, τη σεροτονίνη και τη γλυκοζυλτρανσφεράση [3, 13].

Ο γλυκοκάλυκας είναι μια λεπτή στοιβάδα που περιβάλλει την μεμβράνη των αιμοπεταλίων εξωτερικά και αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, βλεννοπολυσακχαρίτες και προσροφημένες πρωτεΐνες του πλάσματος [14, 15]. Εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας του σιαλικού οξέος το οποίο είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μεμβράνη έχει ηλεκτραρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσκόλληση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας τους στο αίμα [16].

Η κυτταρική μεμβράνη περιβάλλει εξωτερικά το κύτταρο και ρυθμίζει εκλεκτικά τη δίοδο ουσιών από και προς το κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει εξωκυττάρια μηνύματα και να μεταφέρει τις πληροφορίες στα ενδοκυττάρια οργανίδια. Η μεμβράνη αποτελείται από μια φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα στην οποία είναι βυθισμένες αρκετές γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και χοληστερόλη [8, 17-19]. Έχει προταθεί ότι, η κυτταρική μεμβράνη ακολουθεί τη θεωρία του ρευστού μωσαϊκού προτύπου, σύμφωνα με το οποίο τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν μια διπλοστοιβάδα με το υδρόφοβο άκρο τους στο εσωτερικό και το υδρόφιλο στην επιφάνεια της μεμβράνης. Μέσα στη διπλοστοιβάδα εντοπίζονται ανομοιόμορφα κατανεμημένες οι πρωτεΐνες με τέτοιο τρόπο ώστε είτε να διαπερνούν τη μεμβράνη σε όλο το πάχος της (ενδογενείς πρωτεΐνες), είτε να βρίσκονται εξωτερικά σε μία από τις δύο μεμβρανικές επιφάνειες (εξωτερικές πρωτεΐνες) (Εικόνα 1.4) [20, 21]. Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι η σφιγγομυελίνη (SM) που καλύπτει το 17% της επιφάνειάς της, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) που καλύπτει το 27%, η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI) που καλύπτουν το 10% και το 5% αντίστοιχα [22, 23]. Τα φωσφολιπίδια αυτά είναι ασύμμετρα τοποθετημένα, γεγονός που βοηθάει στην αποφυγή της πήξης του αίματος υπό φυσιολογικές συνθήκες [24]. Επιπρόσθετα, αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως η PS και η PI που εκφράζονται κυρίως στο εσωτερικό

της πλασματικής μεμβράνης διατηρούν την επιφάνεια των αιμοπεταλίων σε μια μη προθρομβωτική κατάσταση [8, 25].



Εικόνα 1.4: Δομή τυπικής φωσφολιπιδιακής διπλοστοιβάδας σύμφωνα με τη θεωρία του ρευστού μωσαϊκού προτύπου.

Η διαμόρφωση πολλών από τις γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς προσκόλλησης έχουν διαμόρφωση υποδοχέα. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι ιντεγκρίνες και οι πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες [26]. Στον πίνακα 1.1, δίνονται οι σημαντικότεροι γλυκοπρωτεΐνικοί υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και οι προσδέτες τους.

Τα πιο σημαντικά μόρια προσκόλλησης που εντοπίζονται στα αιμοπετάλια είναι οι ιντεγκρίνες, ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις με τα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και προσκόλλησης σε άλλα κύτταρα. Οι ιντεγκρίνες είναι μη ομοιοπολικά συμπλέγματα, τα οποία αποτελούνται από δύο αλυσίδες α και β, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων είναι εξωκυττάριο και περιέχουν μικρές κυτταροπλασματικές ακολουθίες. Οι ιντεγκρίνες απαιτούνται για την εξασφάλιση της σταθερής προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα ή σε

έναν αναπτυσσόμενο θρόμβο. Οι ιντεγκρίνες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση των κυττάρων. Αρχικά γίνεται ενεργοποίηση των ιντεγκρινών προκειμένου αυτές να είναι ικανές να συνδεθούν με υψηλή συγγένεια στους προσδέτες τους. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν διάφορες $β_1$ και $β_3$ ιντεγκρίνες, όπως την $α_5\beta_1$ (VLA-5), $a_6\beta_1$ (VLA-6), $a_2\beta_1$ (GPIa/IIa, VLA-2 ή CD49b/CD29) και GPIIb/IIIa ($a_{IIb}\beta_3$). Αυτά τα μόρια μεσολαβούν στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα μόρια της διακυτταρικής προσκόλλησης (ICAMs) και στα συνενωτικά μόρια προσκόλλησης (JAMs) στα λευκοκύτταρα, στο ενδοθήλιο και στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η φιβρονεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο [5, 27-29].

Γλυκοπρωτεϊνικοί	Προσδέτης
Υποδοχείς	(ligand)
GPIa/IIa (VLA-2, $\alpha_2\beta_1$)	Κολλαγόνο Ι, ΙΙ
GPIc/IIa (VLA-5, $\alpha_5\beta_1$)	Φιβρονεκτίνη
	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF,
GPH0/IIIa (a _{IIb} p ₃)	θρομβοσπονδίνη
GPV	Υπόστρωμα θρομβίνης
GPIV (GPIIIb)	Θρομβοσπονδίνη, Κολλαγόνο
GPIb/IX	vWF, θρομβίνη
Υποδοχέας βιτρονεκτίνη	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF,
$(\alpha_v\beta_3)$	θρομβοσπονδίνη
Περιοχή GPIc/IIa ($\alpha_6\beta_1$)	Λαμινίνη

Πίνακας 1.1: Οι σημαντικότεροι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων και οι προσδέτες τους.

β) Δομική ζώνη: Αποτελείται από τον κυτταροσκελετό, τους μικροσωληνίσκους και τον υπομεμβρανικό σκελετό. Στον κυτταροσκελετό που αποτελεί το μεγαλύτερο οργανίδιο του κυττάρου απαντάται κυρίως η ακτίνη και σε μικρότερο ποσοστό η μυοσίνη. Το δισκοειδές σχήμα, η αλλαγή σχήματος και η αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων οφείλεται σε αυτές τις πρωτεΐνες [1, 30].

Αιμοπετάλια

γ) Ζώνη οργανιδίων: Τα αιμοπετάλια περιέχουν τρεις τύπους αποθηκευτικών κοκκίων, τα α-κοκκία [31], τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα. Επίσης περιέχουν μιτοχόνδρια, γλυκογόνο και μικροϋπεροξυσώματα. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων είναι ο μεγάλος αριθμός βιολογικά ενεργών μορίων, μερικά από τα οποία απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις και βρίσκονται αποθηκευμένα στα κοκκία. Αυτά τα μόρια μεταφέρονται στα σημεία όπου υπάρχει αγγειακή βλάβη στρατολογώντας άλλα κύτταρα στο αίμα. Σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα κοκκία εντοπίζονται κοντά στις μεμβράνες του ανοιχτού πολυκάναλου συστήματος (OCS), ενώ κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης τα κοκκία συγχωνεύονται και εκκρίνονται μέσα στο OCS [3, 8, 32].

Τα α-κοκκία είναι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος, διαμέτρου 200-500 nm και εντοπίζονται στη μεγαλύτερη συχνότητα (περίπου 40-80 ανά αιμοπετάλιο), αποτελώντας το 10% περίπου του όγκου των αιμοπεταλίων, δεκαπλάσιο ποσοστό από αυτό των πυκνών κοκκίων [3, 5, 8, 31, 33, 34]. Διαθέτουν σφαιρικό σχήμα με έναν πυρήνα στο κέντρο και προέρχονται από το δίκτυο Golgi [8, 35]. Αποτελούν τις κύριες αποθήκες φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως των κατιοντικών πρωτεϊνών, χημειοκινών της C-X-C και της C-C οικογένειας καθώς και των ιντερλευκινών. Επίσης, περιέχουν πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως το Fg, τη φιβρονεκτίνη, ένζυμα όπως την α₁-αντιθρυψίνη, πρωτεΐνες όπως την α₂μακροσφαιρίνη, καθώς και παράγοντες πήξης [3, 36]. Επιπλέον, τα α-κοκκία περιέχουν την ιντεγκρίνη α_{11b}β₃ και την Ρ-σελεκτίνη, οι οποίες εκφράζονται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους [8, 37, 38]. Τέλος, παρά το γεγονός ότι τα ακοκκία βρίσκονται σε αφθονία, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με τον τρόπο παραγωγής τους κατά τη μεγακαρυοποίηση [31].

Τα πυκνά κοκκία (δ-κοκκία) [13] διαμέτρου 250 nm περιέχουν μικρά μόρια τα οποία δεν είναι πρωτεΐνες και εκκρίνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τέτοια μόρια είναι η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, η ισταμίνη, τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , οι κατεχολαμίνες, καθώς και τα νουκλεοτίδια ADP και τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Το ADP είναι ένας ασθενής αιμοπεταλιακός αγωνιστής ο οποίος πυροδοτεί την αλλαγή σχήματος, την απελευθέρωση κοκκίων και τελικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [5, 8, 39].

Τα αιμοπετάλια περιέχουν μόνο λίγα πρωτογενή και δευτερογενή λυσοσώματα [40]. Τα λυσοσώματα δημιουργούνται κατά την ωρίμανση των MKs πριν την ανάπτυξη των α-κοκκίων και [41] αποθηκεύουν ένα μεγάλο αριθμό αποικοδομητικών ενζύμων, όπως

Αιμοπετάλια

είναι οι καθεψίνες D και E, η β-γαλακτοζιδάση, η αρυλοσουλφατάση, κατιοντικές πρωτεΐνες με βακτηριοκτόνο δράση, όπως η β-γλυκουρονιδάση, η ελαστάση και η κολλαγενάση, καθώς και οι όξινες φωσφατάσες και υδρολάσες [5, 8, 13, 42]. Η κύρια λειτουργία των λυσοσωμάτων είναι η αποικοδόμηση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων, τα οποία προσλαμβάνονται μέσω της φαγοκυττάρωσης [3, 8]. Επίσης, διαδραματίζουν ρόλο στην απενεργοποίηση ή αποικοδόμηση της ηπαρίνης [5].

Πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι υπάρχουν μόρια όπως οι ντεφενσίνες, τα οποία δεν εντοπίζονται σε κανένα από τα τρία προαναφερθέντα κοκκία, οπότε μάλλον υπάρχουν είτε ως κυτοσολικά μόρια είτε ως συστατικά ενός τύπου κοκκίου που δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη [5, 43].

Τα αιμοπετάλια περιέχουν ένα σχετικά μικρό αριθμό μιτοχοδρίων, τα οποία είναι πολύ μικρού μεγέθους σωματίδια και απαντώνται στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων. Τα μιτοχόνδρια είναι μόρια στα οποία λαμβάνουν χώρα σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις όπως η φωσφορυλίωση και είναι μια πηγή ενέργειας για τα αιμοπετάλια [8].

Τα υπεροξυσώματα είναι μικρά οργανίδια τα οποία βρίσκονται επίσης στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων και περιέχουν το ένζυμο καταλάση [8].

Τα κοκκία του γλυκογόνου αποτελούν το κύριο συστατικό του κυτοσολίου. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι απαραίτητη για την παραγωγή του ATP που χρειάζεται για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων.

δ) Ζώνη του μεμβρανικού συστήματος: Αποτελείται από το OCS και το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS).

Το OCS είναι ένα σύστημα μικροσωληνίσκων που συνδέουν το κυτταρόπλασμα με την επιφάνεια του αιμοπεταλίου και αποτελεί μια εύκολη οδό για την είσοδο μορίων από το πλάσμα στα αιμοπετάλια και για την μετάβαση ουσιών του ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου προς την εξωτερική επιφάνεια [44]. Επιπρόσθετα, το OCS μπορεί να χρησιμεύσει ως αποθήκη εκτεταμένων εσωτερικών μεμβρανών, οι οποίες μπορούν να επιταχύνουν το σχηματισμό και την εξάπλωση ψευδοποδίων οδηγώντας τελικά στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε μια ενεργοποιημένη επιφάνεια. Τέλος, το OCS μπορεί να λειτουργήσει ως θέση αποθήκευσης για τις γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης [8, 45].

Τέλος, το DTS το οποίο αρχικά χαρακτηρίστηκε ιστοχημικά από την παρουσία της ενεργότητας της υπεροξειδάσης, αποτελεί υπόλειμμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου των MKs. Επιπλέον, είναι η σημαντικότερη αποθήκη ιόντων ασβεστίου των αιμοπεταλίων

τα οποία απελευθερώνονται κατόπιν ενεργοποίησής τους [8, 46, 47]. Η απελευθέρωση των ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου από το DTS οδηγεί στην ανακατανομή του υποδοχέαιντεγκρίνης α_{IIb}β₃, στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και στην απελευθέρωση των κοκκίων. Επιπρόσθετα, είναι το κύριο οργανίδιο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA), το οποίο οδηγεί στην παραγωγή TxA₂, λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και PAF, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους σε πολυποίκιλες φλεγμονώδεις αντιδράσεις [48].

Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους

Η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από διάφορους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων επηρεάζονται από διάφορους αγωνιστές (διεγέρτες) και προσκολλητικές πρωτεΐνες. Σε γενικές γραμμές, η διέγερση των αιμοπεταλιακών υποδοχέων προκαλεί την εκκίνηση δύο διαφορετικών διαδικασιών: (1) τη διέγερση ποικίλων σηματοδοτικών πορειών που καταλήγουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των κοκκίων τους και (2)στην ικανότητα των αιμοπεταλίων να συνδέονται άλλα με αιμοπετάλια/προσκολλητικές πρωτεΐνες, οδηγώντας στη δημιουργία του θρόμβου. Επειδή και οι δύο αυτές διαδικασίες μπορούν να προκαλέσουν θρόμβωση και απόφραξη του αγγείου, αρκετοί από αυτούς τους υποδογείς μελετώνται ως στόχοι για την αποφυγή της δημιουργίας θρόμβου [49]. Στην εικόνα 1.5, φαίνονται οι κυριότεροι αγωνιστές των αιμοπεταλίων, οι υποδοχείς τους καθώς και οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 1.5: Μηχανισμοί ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Lars Faxalv και Knut Falker).

Θρομβίνη

Η θρομβίνη είναι η κύρια πρωτεάση του συστήματος πήξης. Σύμφωνα με ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρόσφατο μοντέλο, η διαδικασία της πήξης μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις φάσεις: α) τη φάση έναρξης όπου παράγονται μικρές ποσότητες ενεργών παραγόντων πήξης, β) τη φάση ενίσχυσης όπου ενισχύονται περαιτέρω τα επίπεδα των ενεργών παραγόντων πήξης, γ) και τέλος τη φάση εξάπλωσης, στην οποία οι παράγοντες πήξης δεσμεύονται σε προθρομβωτικές μεμβράνες των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και σχηματίζονται θρόμβοι από ινώδες. Όταν υποστεί βλάβη το ενδοθήλιο, τότε ο ιστικός παράγοντας (TF) εκτίθεται στην κυκλοφορία του αίματος και δεσμεύεται στον παράγοντα VII, ο οποίος μετατρέπεται στην ενεργόποίηση του παράγοντα X και της προθρομβίνης. Το αποτέλεσμα είναι ότι μικρές ποσότητες θρομβίνης ενεργοποιούν τον παράγοντα XI-IX στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, μετά από διάφορα στάδια, το σύμπλοκο FXa/FVa συνεισφέρει στη μετατροπή της προθρομβίνης σε ενεργό

θρομβίνη [29, 50]. Ενώ αυτό το κυτταρικό βιολογικό μοντέλο της πήξης κερδίζει έδαφος, η πιο κλασσική ταξινόμηση ανάμεσα στην ενδογενή και εξωγενή οδό χρησιμοποιείται ακόμη ευρέως [29, 51].

Η παραγωγή της θρομβίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων είναι μια διαδικασία με την οποία τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διεγείρουν τη διαδικασία της πήξης. Η προθρομβίνη είναι μια σφαιρίνη του πλάσματος που συντίθεται στο ήπαρ, η οποία βρίσκεται σε ανενεργή μορφή. Κατά την ενεργοποίησή της, η οποία πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της πήξης του αίματος, η προθρομβίνη μετατρέπεται σε α-θρομβίνη, μέσω της δράσης του μετατρεπτικού παράγοντα της προθρομβίνης. Η θρομβίνη στη συνέχεια, αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα το Fg και με την πρωτεολυτική της δράση οδηγεί στο σχηματισμό ινώδους [29].

Εκτός από τη διάσπαση του ινωδογόνου και άλλων υποστρωμάτων που βρίσκονται στην κυκλοφορία, η θρομβίνη λειτουργεί ως διαμεσολαβητής ικανός να προκαλέσει διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις σε αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) και λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs). Η θρομβίνη ενεργοποιεί τον κύκλο της PI, τον μεταβολισμό του AA και το σχηματισμό του TxA₂ και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου [Ca²⁺]_i, στην αποκοκκίωση και τέλος στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, είναι ο μοναδικός παράγοντας, ο οποίος εξαρτάται από τη βιταμίνη K και μπορεί να δεσμεύεται σε εξειδικευμένους πρωτεϊνικούς υποδοχείς στα αιμοπετάλια [52].

Η θρομβίνη είναι ένας από τους πιο ισχυρούς ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων, αφού μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 0.1 nM. Παρόλο που άλλοι αγωνιστές των αιμοπεταλίων μπορούν επίσης να προκαλέσουν υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων, κανένας δεν φαίνεται να δεσμεύεται τόσο αποτελεσματικά στη φωσφολιπάση C όσο η θρομβίνη. Από τη στιγμή της προσθήκης της θρομβίνης, μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα η συγκέντρωση του κυτοσολικού Ca²⁺ δεκαπλασιάζεται πυροδοτώντας διάφορες βιοχημικές οδούς εξαρτώμενες από το Ca²⁺, όπως είναι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂. Η θρομβίνη επίσης ενεργοποιεί την κινάση Rho οδηγώντας στην επαναδιευθέτηση της ακτίνης του κυτταροσκελετού και στην αλλαγή σχήματος, αποκρίσεις οι οποίες μειώνονται σημαντικά ή είναι απούσες στα αιμοπετάλια των ποντικών τα οποία δεν διαθέτουν G_{13a}. Τελικά, η θρομβίνη είναι ικανή να αναστείλει την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, είτε άμεσα μέσω μέλους της οικογένειας Gi είτε έμμεσα μέσω του ADP [53, 54].

Αιμοπετάλια

Η θρομβίνη δεσμεύεται σε δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων. Πρώτον, δεσμεύεται σε μια κατηγορία υποδοχέων οι οποίοι συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες και ονομάζονται υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (PARs) (Protease Activated Receptors) [3, 53, 55, 56] και δεύτερον στη γλυκοπρωτεΐνη GPIb-IX-V [52, 57]. Οι υποδοχείς των PARs συνδέονται με τις G_a , τις G_{12}/G_{13} και σε μερικές περιπτώσεις με τις Gi πρωτεΐνες (Εικόνα 1.6) [58-60]. Έχουν βρεθεί τέσσερις υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των PARs. Από αυτούς, οι PAR1 και PAR4 βρίσκονται στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, ενώ τα αιμοπετάλια των ποντικιών εκφράζουν τους PAR3 και PAR4 [53, 61-63]. Ο PAR-1 και ο PAR-4 αυξάνουν το κυτοσολικό Ca^{2+} μέσω της διέγερσης της Gq και της φωσφολιπάσης C (PLC) [52, 64]. Το αποτέλεσμα είναι η βαθμιαία αύξηση του σήματος του Ca²⁺, το οποίο από μόνο του δεν επαρκεί για να προκαλέσει την έκθεση της PS [65]. Εντούτοις, η θρομβίνη βελτιώνει σε σημαντικό βαθμό την έκθεση της PS, η οποία επάγεται από το κολλαγόνο. Σε αυτή την περίπτωση, η δέσμευση στον PAR1 φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης [66] παρά η δέσμευση της θρομβίνης στον GPIb [57]. Οι PAR-1, PAR-3 και PAR-4 ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη, ενώ ο PAR-2 μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη θρυψίνη, θρυπτάση και τους παράγοντες πήξης VIIa και Xa, αλλά όχι από τη θρομβίνη [67, 68]. Μελέτες έδειξαν ότι ο PAR1 αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της θρομβίνης και προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε μικρές συγκεντρώσεις θρομβίνης, ενώ ο PAR4 απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης.



Εικόνα 1.6: Οι κύριοι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς της θρομβίνης στους ανθρώπους (Τροποποιημένο από Bhatt D.L., et al.) [60].

Μελέτες έδειξαν ότι ο PAR1 αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της θρομβίνης και προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε μικρές συγκεντρώσεις θρομβίνης (<0.1 nM), ενώ ο PAR4 απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης (>30 nM) [3, 62]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η διέγερση της συσσώρευσής τους από τον PAR1 χαρακτηρίζεται από πολλαπλές διαδικασίες που οδηγούν στο σχηματισμό ενός πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου. Η μεγαλύτερη δραστικότητα της θρομβίνης στην ενεργοποίηση του PAR1 οφείλεται μάλλον στην παρουσία μιας αλληλουχίας αμινοξέων που υπάρχει στην ιρουδίνη κοντά στο καρβοζυτελικό άκρο του, η οποία διευκολύνει την πρόσδεση της θρομβίνης, ενώ αυτή απουσιάζει από τον PAR4 [69]. Η θρομβίνη περιέχει στο μόριό της ειδικές περιοχές που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου, οι οποίες εντοπίζονται μακριά από το ενεργό της κέντρο [70]. Συνθετικά πεπτίδια, όπως τα πεπτίδια του αγωνιστή της θρομβίνης (thrombin receptor agonist peptide-6, TRAP-6), είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα της θρομβίνης απουσία αυτής.

Ο GPIb-IX-V ανήκει στην οικογένεια των πλούσιων σε λευκίνη γλυκοπρωτεϊνών. Είναι ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τις GPIba και GPIbβ οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Οι GPIba και GPIbβ συνδέονται με την GPIX και την GPV με μη

Αιμοπετάλια

ομοιοπολικούς δεσμούς σε αναλογία 2:2:2:1 [71]. Επιπλέον, η GPIb περιέχει μια θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας για την α-θρομβίνη στα κατάλοιπα αμινοξέων 268-287 στην αμινοτελική σφαιρική περιοχή και μπορεί να δεσμεύσει δύο διαφορετικά μόρια θρομβίνης αλληλεπιδρώντας με τις θέσεις Ι και ΙΙ της θρομβίνης. Η ενεργοποίηση με αθρομβίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της ζ ισομορφής της PLA₂ που οδηγεί στο σχηματισμό του AA καθώς και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης (PTK). Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην αύξηση του [Ca²⁺]_i, στην έκκριση των κοκκίων και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [63, 72, 73].

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3phosphocholine, PAF) είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό φωσφολιπίδιο, το οποίο είναι ικανό να προκαλεί, τόσο in vivo όσο και in vitro, ενεργοποίηση, συσσώρευση και έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων [74, 75]. Αποτελεί ένα χημικό διαβιβαστή, με παρόμοια λειτουργικότητα με αυτή των ορμονών και των κυτοκινών [76, 77]. Η δράση του PAF δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίνεται, αλλά και σε παρακείμενα κύτταρα, εμφανίζοντας παρακρινή, ενδοκρινή και συνδετοκρινή δράση. Ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, ο σχηματισμός θρόμβου και οι αλλεργικές αντιδράσεις [78]. Στα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας δεν ανιχνεύεται, ενώ μετά τη διέγερση παράγεται και εκκρίνεται ή εκφράζεται στην μεμβράνη τους. Η δομή του υποδοχέα του PAF έχει περιγραφεί πλήρως και στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων εντοπίζονται περίπου 300 αντίγραφα του υποδοχέα. Ο υποδοχέας του PAF ελέγχεται από τη Ca²⁺-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση της καλμοδουλίνης [79].

Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν PAF (κυμαίνεται από: 0.25-3 pmoles/ 10^8 αιμοπετάλια) αφού ενεργοποιηθούν από συγκεκριμένους αγωνιστές, όπως το ιονοφόρο του Ca²⁺ (A23187), η θρομβίνη [80, 81] και το κολλαγόνο, ενώ παρουσία ADP και AA, τα κύτταρα δεν είναι σε θέση να παράγουν τον συγκεκριμένο αγωνιστή [82]. Επιπρόσθετα, ο PAF εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους και βρίσκεται συνδεδεμένος στα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) [83, 84]. Η δράση του στα αιμοπετάλια, έχει ως συνέπεια την αποκοκκίωση, την αλλαγή σχήματος, τη συσσώρευση,

Αιμοπετάλια

το μεταβολισμό του AA και σύνθεση του TXA₂, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺. Τα αιμοπετάλια διαθέτουν μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων του PAF, ο οποίος στηρίζεται στη δράση της ακετυλοϋδρολάσης του PAF (PAF-AH) (ή Lipoprotein associated phospholipase A₂, Lp-PLA₂), ενός ενζύμου που υδρολύει τον εστερικό δεσμό στη θέση sn-2 απομακρύνοντας την οξική ομάδα και παράγοντας τον βιολογικά ανενεργό μεταβολίτη lyso-PAF [85].

ADP

Το ADP είναι αποθηκευμένο σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και εκκρίνεται κατά την ενεργοποίησή τους [53, 64]. Επιπλέον, απελευθερώνεται από κατεστραμμένα κύτταρα που υπάρχουν σε σημεία ύπαρξης αγγειακής βλάβης λειτουργώντας με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο για τη διέγερση των αιμοπεταλίων και τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Το ADP είναι ένας σχετικά ασθενής αγωνιστής μικρού μοριακού βάρους που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των αιμοπεταλίων αφού ενισχύει την αρχική φυσιολογική αιμοστατική απόκριση. Μελέτες συσσωρευομετρίας ex vivo έχουν δείξει ότι όλοι οι υπόλοιποι αγωνιστές εξαρτώνται σε ορισμένο βαθμό από το απελευθερωμένο ADP προκειμένου να εμφανίσουν τη μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, αυτή η εξάρτηση διαφέρει ανάλογα με τον αγωνιστή και είναι δοσοεξαρτώμενη. Όταν προστίθεται στα αιμοπετάλια in vitro, το ADP προκαλεί το σχηματισμό του ΤxA2, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την αύξηση του κυτοσολικού Ca^{2+} , την αλλαγή σχήματος, την έκκριση και αναστέλλει το σχηματισμό του κυκλικού AMP (cAMP) [53, 86-88]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το ADP πραγματοποιείται μέσω πουρινεργικών υποδοχέων όπως ο P2Y1, ο P2X1 και ο P2Y12 [89, 90].

Ο P2Y₁ εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς, όπως στην καρδιά, στα αιμοφόρα αγγεία, στα κύτταρα του αίματος, στο νευρικό ιστό, στον προστάτη και στις ωοθήκες [3, 64, 91]. Ο P2Y₁ συνδέεται με μια Gaq πρωτεΐνη συνεισφέροντας στα αρχικά στάδια της συσσώρευσης και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της PLCβ. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την Rac καθώς και την ενεργοποιούμενη από την p21 κινάση. Αντίθετα, ο P2Y₁ δεν φαίνεται να συνδέεται με μέλη της οικογένειας G_i [3, 53]. Η ενεργοποίηση της PLCβ μέσω του P2Y₁ οδηγεί σε αύξηση της [Ca²⁺]_i, στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευσή τους [53, 86, 92, 93]. Σύμφωνα
Αιμοπετάλια

με μελέτες που έχουν γίνει σε κύτταρα ποντικιού, απουσία του υποδοχέα, το ADP είναι σε θέση να αναστείλει την παραγωγή cAMP, αλλά η ικανότητά του να προκαλεί αύξηση του κυτοσολικού Ca²⁺, αλλαγή σχήματος και συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι μειωμένη [53, 86, 94, 95]. Περίπου 150 θέσεις δέσμευσης του P2Y₁ υποδοχέα εκφράζονται ανά αιμοπετάλιο [3, 96]. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας πυροδοτεί την κινητοποίηση του ασβεστίου από τις ενδοκυττάριες αποθήκες, η οποία οδηγεί στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και σε μια ασθενή συσσώρευση σε απόκριση προς τον αγωνιστή ADP. Το αποτέλεσμα είναι ότι, σε ενδοκυττάριο επίπεδο, το σήμα του ασβεστίου εξαφανίζεται, ενώ διατηρείται η ικανότητα του ADP να αναστέλλει το σχηματισμό του cAMP [92, 93]. Τέλος, ο P2Y₁ υποδοχέας συμμετέχει επίσης στη συσσώρευση σε απόκριση προς το ADP αλλαγή του σχήματος όταν παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του TxA₂ [3, 97].

Ο υποδοχέας P2Y₁₂ δεσμεύεται περισσότερο σε μέλη της οικογένειας των G_i πρωτεϊνών και όχι των G_z . Το βασικό μέλος της οικογένειας G_i φαίνεται να είναι η G_{i2} πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιογημικές αντιδράσεις που προκαλούν την πλήρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [53, 98-100]. Ο υποδοχέας συνδέεται με την G_{α12} και ελαττώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP [3]. Επιπλέον, συμμετέχει σε σημαντικό βαθμό και είναι πιο ενεργός από τον $P2Y_1$ στα τελικά στάδια της συσσώρευσης [29, 101]. Ο P2Y₁₂ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της ενεργότητας της AC [102] διαμέσου της ενεργοποίησης της Gai2, η οποία ανήκει στην κατηγορία των G πρωτεϊνών αποτελώντας μια σημαντική ένωση του σηματοδοτικού μονοπατιού που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ [3, 103-105]. Εντούτοις, η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης (AC) η οποία οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του cAMP δεν επαρκεί από μόνη της για να προκαλέσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [99]. Για αυτό το λόγο, απαιτούνται άλλοι σηματοδοτικοί οδοί για την πλήρη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την επακόλουθη συσσώρευση [3]. Ο P2Y₁₂ συμμετέχει στη αποκοκκίωση των πυκνών κοκκίων [106], ενώ δεν συμμετέχει στην κινητοποίηση του Ca²⁺ και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων [107, 108]. Η σηματοδότηση του συγκεκριμένου υποδοχέα διεγείρει την επιφανειακή έκφραση της Pσελεκτίνης και την έκκριση του ΤxA₂ [3, 109]. Η ενεργοποίηση από κοινού των υποδοχέων P2Y1 και P2Y12 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική συσσώρευση των αιμοπεταλίων αφού η ξεχωριστή αναστολή του ενός από τους δύο με εξειδικευμένους ανταγωνιστές καταλήγει σε δραματική μείωση της συσσώρευσης [3, 104].

Αιμοπετάλια

Ο P2X₁ είναι ο τρίτος πουρινεργικός υποδοχέας που συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Το ATP είναι ο φυσιολογικός αγωνιστής του υποδοχέα αυτού, ενώ το ADP είναι ένας ανταγωνιστής του [110]. Η ενεργοποίηση του P2X₁ οδηγεί στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, όπου αυτά γίνονται σφαιρικά χωρίς όμως τη δημιουργία προεκτάσεων από ψευδοπόδια [111, 112]. Επιπλέον, προκαλεί κεντροποίηση των κοκκίων χωρίς όμως να απελευθερώνει το περιεχόμενό τους [113, 114], το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην ενίσχυση της απόκρισης των αιμοπεταλίων σε μικρότερες συγκεντρώσεις άλλων φυσιολογικών αγωνιστών όπως το κολλαγόνο. Τα αιμοπετάλια περιέχουν διάφορους διαύλους θετικών και αρνητικών ιόντων, αλλά η λειτουργία τους στην αιμόσταση δεν έχει διερευνηθεί σε σημαντικό βαθμό. Μόνο στην περίπτωση του υποδοχέα P2X₁, οι δίαυλοι των Ca²⁺ έχουν σημαντικό ενισχυτικό ρόλο, ο οποίος αποτυπώνεται στην επαγόμενη από το κολλαγόνο ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στο σγηματισμό του θρόμβου [29, 115, 116].

Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο αποτελεί ένας από τους πιο ισχυρούς αγωνιστές των αιμοπεταλίων. Τα κολλαγόνα είναι οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) του υπενδοθηλίου. Εκτός του ότι το κολλαγόνο είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη των διαφόρων συνδετικών ιστών, επιπλέον είναι απαραίτητο στη διαδικασία προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και στο σχηματισμό του θρόμβου. Συνολικά, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν 18 τύποι κολλαγόνου από τους οποίους οι 9 βρίσκονται στο αρτηριακό τοίχωμα. Μόνο το ινώδες κολλαγόνο τύπου Ι, ΙΙΙ, V και VI, καθώς και οι τύποι ΙV και VIII του κολλαγόνου που δεν βρίσκεται σε ινώδη μορφή είναι θρομβογόνοι [63, 117]. Έχουν βρεθεί αρκετές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ιντεγκρίνες και μη, που φαίνεται ότι έχουν χαρακτηριστικά υποδοχέων εξειδικευμένα για το κολλαγόνο [118]. Παρόλο που τα αιμοπετάλια έχουν διάφορους υποδοχείς για το κολλαγόνο, όπως οι GPVI, GPIa/IIα ή α₂β₁, p65, p47, p85/90, TIIICBP, GPIV ή CD36, μόνο η ιντεγκρίνη α₂β₁ και η GPVI θεωρούνται σημαντικοί για τη δέσμευση στο κολλαγόνο και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [53, 63, 117, 119].

Η αρχική ασθενής πρόσδεση των αιμοπεταλίων στον ακινητοποιημένο vWF διαμέσου του υποδοχέα GPIb σε περιοχές βλάβης του ενδοθηλίου, σταθεροποιείται στη συνέχεια με πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μέσω της α₂β₁ και της GPVI. Η

Αιμοπετάλια

πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Στην ενεργοποίηση αυτή συμμετέχουν και άλλοι αγωνιστές, όπως το ADP, η σεροτονίνη και το TxA₂ οι οποίοι εκκρίνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα α_{IIb}β₃ στον οποίο προσδένεται το Fg, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου [120]. Η δέσμευση του κολλαγόνου στα αιμοπετάλια προκαλεί την ενεργοποίηση της οικογένειας των Src και Syk κινασών της τυροσίνης και η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLC_{γ2} και τη δημιουργία πτυχωτών προεκτάσεων [121].

Η ιντεγκρίνη $a_2\beta_1$ αποτελεί υποδοχέας του κολλαγόνου τύπου Ι και ΙΙΙ όταν υπάρχουν υψηλές διατμητικές δυνάμεις. Έρευνες έδειξαν ότι ο υποδοχέας αναγνωρίζει την αλληλουχία GFOGER του κολλαγόνου [122]. Η $a_2\beta_1$ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο και η συμβολή της στη σταθεροποίηση του θρόμβου είναι μεγάλη [120]. Η $a_2\beta_1$ συμμετέχει στην προσκόλληση στο κολλαγόνο και ενεργεί ως μια πηγή σηματοδότησης εξαρτώμενης από διάφορες ιντεγκρίνες μετά από σύζευξη [53, 123, 124]. Εντούτοις, αυτή η αλληλεπίδραση χρειάζεται πιθανόν ένα αρχικό στάδιο σηματοδότησης το οποίο ενεργοποιεί την $a_2\beta_1$, όπως και ο υποδοχέας του ινωδογόνου, $a_{Ilb}\beta_3$ ενεργοποιείται μέσω σηματοδότησης μέσα στα αιμοπετάλια. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση της $a_2\beta_1$ έχουν ελαττωμένη απόκριση στο κολλαγόνο, όπως τα αιμοπετάλια των ποντικών τα οποία δεν εκφράζουν τις β_1 ιντεγκρίνες, όπου η ικανότητα αυτών των αιμοπεταλίων να δεσμευτούν στο κολλαγόνο δοκιμάζεται κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις [125, 126].

Σύμφωνα με πρόσφατα μοντέλα, το κολλαγόνο προκαλεί τη συμπλοκοποίηση της GPVI. Ο πολυμερισμός του διαλυτού κολλαγόνου και η συμπλοκοποίηση των συμπλόκων GPVI/FcRγ συνεισφέρουν στην υστέρηση, η οποία παρατηρείται συχνά όταν το κολλαγόνο προστίθεται στα αιμοπετάλια σε ένα συσσωρευόμετρο. Αυτό οδηγεί στη φωσφορυλίωση της FcRγ από τις κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src, οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε μια περιοχή πλούσια σε προλίνη στην GPVI [53, 127]. Η φωσφορυλίωση δημιουργεί ένα μοτίβο ITAM, το οποίο αναγνωρίζεται από τις παράλληλες SH2 περιοχές της Syk κινάσης. Η συσχέτιση της Syk με το σύμπλοκο της GPVI/FcRγ ενεργοποιεί την Syk και οδηγεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της PLCγ₂. Η απώλεια της Syk μειώνει τις αποκρίσεις σε κολλαγόνο [128]. Στη συνέχεια, η PLCγ₂ υδρολύει την PIP₂, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του κυτοσολικού Ca²⁺ και έμμεσα πυροδοτώντας την εισροή

Αιμοπετάλια

του κυτοσολικού Ca^{2+} , οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο κολλαγόνο υπό ροή μπορούν να απεικονιστούν σε πραγματικό χρόνο [53, 129, 130].

Η GPIV ή CD36 φαίνεται ότι συμμετέχει στην αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο, και μάλιστα τύπου V. Η p65 πρωτεΐνη λειτουργεί ως υποδοχέας για το κολλαγόνο τύπου I και συμμετέχει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στην έκκριση ATP. Τέλος, για την p85/90 πρωτεΐνη ελάχιστα είναι γνωστά. Αυτή φαίνεται να αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο και να συμμετέχει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [118].

TxA_2

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, παρατηρείται αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$, και ενεργοποίηση του κύκλου της PI, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLA2, η οποία καταλύει στη συνέχεια την απελευθέρωση του ΑΑ, που είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Το TxA₂ παράγεται de novo ενζυματικά από το AA και απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως το ADP [3]. Το ΑΑ με τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγονάσης-1 (COX-1) μετατρέπεται στα ασταθή ενδοϋπεροξείδια PGG2 και PGH2 και στη συνέχεια με τη δράση της συνθάσης του θρομβοξανίου (TS) σε TxA₂ [3, 131, 132]. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων που δεσμεύουν το TxA₂, αναγνωρίζουν ακόμη και το ενδοϋπεροξείδιο PGH₂ και για αυτό ονομάστηκαν υποδοχείς TxA_2/PGH_2 [133]. Στη συνέχεια, ο υποδοχέας TxA_2/PGH_2 μετονομάστηκε σε υποδοχέα ΤΡ από τη Διεθνή Ένωση Φαρμακολογίας της Ταξινόμησης των Υποδοχέων Προστανοϊδών (International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors) [134]. Ο ΤΡ υποδοχέας (57 kDa) αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές αέλικες που συνδέονται μεταξύ τους με ενδοκυττάριες και εξωκυττάριες αλυσίδες [135]. Ο συγκεκριμένος υποδογέας που ανήκει στην οικογένεια των προστανοϊδών συζεύγνυται με G πρωτεΐνες και κατανέμεται ευρέως στο καρδιαγγειακό σύστημα [136]. Οι υποδογείς TP στους ανθρώπους υπάρχουν σε δύο ισομορφές ΤΡα και ΤΡβ, οι οποίες διαφέρουν στο τελικό C άκρο στην κυτταροπλασματική τους ακολουθία. Το TxA2 δεσμεύεται στους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς ΤΡα και ΤΡβ. Οι δύο υποδοχείς κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο, αλλά προέρχονται από το εναλλακτικό μάτισμα. Παρόλο που το mRNA για τους ΤΡα και ΤΡβ εντοπίζεται στα αιμοπετάλια, μόνο ο ΤΡα υποδοχέας εκφράζεται στα αιμοπετάλια, ενώ ο TPβ εκφράζεται στα ECs [63, 137, 138]. Οι TP υποδοχείς εκφράζονται

Αιμοπετάλια

και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι σχετίζονται με την αθηροθρόμβωση, όπως είναι τα SMCs, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα [63, 137, 138]. Επιπλέον, οι επιδράσεις του TxA₂ στα αιμοπετάλια μεσολαβούνται κυρίως διαμέσου του TPa [3, 139]. Η μεσολαβούμενη από τον ΤΡα μεταγωγή σήματος λαμβάνει χώρα μέσω διαφόρων G πρωτεϊνών, περιλαμβάνοντας τις Gq και G_{12/13}. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C. Στη συνέχεια, αυτό το ένζυμο αποικοδομεί τα μεμβρανικά φωσφοϊνοσιτίδια, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP_2) όπως την απελευθερώνοντας την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και τη διακυλογλυκερόλη (DAG). Η DAG ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια πρωτεϊνική κινάση C, η οποία προκαλεί τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η απελευθέρωση της IP3 αυξάνει τα κυτοσολικά επίπεδα του Ca²⁺, τα οποία απελευθερώνονται από το ενδοπλασμικό δίκτυο. Όπως το ADP, έτσι και το TxA₂ εκκρίνεται από τα προσκολλημένα αιμοπετάλια, συνεισφέρει στη στρατολόγηση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και προάγει μεταβολές στο σχήμα των αιμοπεταλίων και στην έκκριση των κοκκίων [3]. Γενικά, ο καθοριστικός ρόλος του TxA2 είναι η ενίσχυση της αρχικής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα τη στρατολόγησή τους στην περιοχή της βλάβης [140]. Η δράση του TxA₂ είναι περιορισμένη στην περιοχή της βλάβης εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής στο πλάσμα και της δράσης που ασκεί στα γειτονικά αιμοπετάλια, η οποία γίνεται στα πρώτα 30 sec μετά από την έκκρισή του.

Όσον αφορά την κλινική σημασία, σε διάφορους ασθενείς η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων έχει αποδοθεί σε βλάβη του αιμοπεταλιακού υποδοχέα του TxA₂. Μια μετάλλαξη (Arg₆₀-Leu) στον πρώτο κυτταροπλασματικό βρόγχο του TPa βρέθηκε σε ασθενείς με ήπια αιμορραγική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίστηκε με δοκιμές συσσωρευομετρίας μέσω μεταβλητών αποκρίσεων στο TxA₂, σε ανάλογα του TxA₂ και σε άλλους αγωνιστές εκτός όμως από τη θρομβίνη [63].

Σεροτονίνη ή 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-ΗΤ)

Ο υποδοχέας της σεροτονίνης (5-ΗΤ) ενεργοποιεί την PLC μέσω μιας Gπρωτεΐνης, οδηγώντας στην αύξηση του [Ca²⁺]_i και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η αλληλουχία του ανθρώπινου υποδοχέα του 5-ΗΤ έχει κλωνοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι πρόκειται για ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα [141]. Εκτός από αγωνιστής των

Αιμοπετάλια

αιμοπεταλίων, η 5-ΗΤ εντοπίζεται αποθηκευμένη στα πυκνά κοκκία [142] και εκκρίνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Επινεφρίνη

Συγκρινόμενη με τη θρομβίνη, η επινεφρίνη είναι ένας ασθενής ενεργοποιητής των ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι μια ήπια αιμορραγική διαταραχή σε ανθρώπους μπορεί να συσχετιστεί με ελαττωμένη συσσώρευση, η οποία προκαλείται από την επινεφρίνη και τον μειωμένο αριθμό υποδοχέων της κατεχολαμίνης. Οι αποκρίσεις της επινεφρίνης στα αιμοπετάλια μεσολαβούνται μέσω των α_{2A} αδρενεργικών υποδοχέων [143-145]. Τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια, η επινεφρίνη έχει την ικανότητα να ενισχύει την επίδραση των άλλων ενεργοποιητών. Αυτή η ισχυροποίηση συνήθως αποδίδεται στην ικανότητα της επινεφρίνης να αναστέλλει το σχηματισμό του cAMP. Από μόνη της, η επινεφρίνη δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια, αλλά ισχυροποιεί την επίδραση άλλων ενεργοποιητών μέσω του αδρενεργικού υποδογέα α2. Αυτός συνδέεται με την Gz πρωτεΐνη [146]. Σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έφεραν τον αδρενεργικό υποδοχέα α2. η επινεφρίνη δεν προκαλούσε την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η αιμορραγία ήταν χρονικά μέτρια παρατεταμένη και η δημιουργία σταθερού θρόμβου ήταν εξασθενημένη [147]. Επιπλέον, η επινεφρίνη προκαλεί την έκκριση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τέλος, δεν έχει καμία ανιχνεύσιμη άμεση επίδραση στη φωσφολιπάση C και δεν προκαλεί αλλαγή σχήματος, αν και αυτή μπορεί έμμεσα να πυροδοτήσει την υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων μέσω διέγερσης του σχηματισμού του ΤxA₂. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι αιμοπεταλιακοί α_{2A} αδρενεργικοί υποδοχείς συζεύγνυνται με τις Gi πρωτεΐνες της οικογένειας των G πρωτεϊνών, αλλά όχι με τις G_{q} ή G_{12} [99, 148].

Προσταγλανδίνη E_2 (PGE₂)

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η σύνθεση των προστανοϊδών στα ECs και στα SMCs αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό. Η βιοσύνθεση της PGE₂ αυξάνεται μέσω των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών στα αγγειακά SMCs και στα μακροφάγα [63].

Αιμοπετάλια

Η PGE₂ εμφανίζει διφασική επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση της προσταγλανδίνης. Παρόλο που οι υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, οι χαμηλές μπορούν να την αυξήσουν. Η PGE₂ ενεργοποιεί τους τέσσερις υποδοχείς EP₁, EP₂, EP₃ και EP₄, οι οποίοι συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες. Κάθε ένας από αυτούς τους υποδοχείς έχει μια ξεχωριστή ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος. Η διέγερση των EP₃ υποδοχέων οδηγεί στην αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των ιόντων ασβεστίου, ενώ η διέγερση των EP₂ και EP₄ υποδοχέων συνήθως αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP διαμέσου της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gas, οδηγώντας στη μείωση των ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιέχουν mRNA για τον υποδοχέα EP₁, όλες τις παραλλαγές ματίσματος του EP₃ καθώς και τον EP₄. Εντούτοις, το mRNA για τους EP₂ υποδοχείς δεν υπάρχει στα αιμοπετάλια [63, 149].

Η επίδραση της PGE₂ στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση του EP₃ υποδοχέα, οδηγώντας στην αναστολή της αύξησης του cAMP, στην αυξημένη κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου και στην αυξημένη έκφραση της Ρσελεκτίνης στα αιμοπετάλια [150]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η PGE₂, η οποία παράγεται από τις αθηροσκληρωτικές πλάκες στα ποντίκια μπορεί να επιταχύνει την αρτηριακή θρόμβωση ενεργώντας μέσω του EP₃ υποδοχέα [63, 151].

Προσκόλληση των αιμοπεταλίων

Ως προσκόλληση ορίζεται το φυσικό και βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο τα αιμοπετάλια μετά από την επαφή τους με το κατεστραμμένο τοίχωμα των αγγείων αλλάζουν συμπεριφορά, μεταβάλλουν το φορτίο της μεμβράνης και το σχήμα τους και τελικά εμφανίζουν ψευδοπόδια με τη βοήθεια των οποίων απλώνονται και τελικά προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια της βλάβης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα σε ήρεμη κατάσταση χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλα κύτταρα του αίματος. Η ενεργοποίησή τους αναστέλλεται τόσο από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) όσο και από την προσταγλανδίνη I₂ (PGI₂) που απελευθερώνουν τα ECs.

Σε περίπτωση όμως τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος, προκαλείται η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου και η έκθεση προς τον ενδοαγγειακό χώρο στοιχείων

Αιμοπετάλια

του υπενδοθηλιακού χώρου. Η προσκόλληση των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο κατεστραμμένο αρτηριακό τοίχωμα αποτελεί το αρχικό στάδιο της πρωτογενούς αιμόστασης [152] και οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας του αιμοπεταλίου που έχουν διαμόρφωση υποδοχέα, οι κυριότερες από τις οποίες είναι οι γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας των ιντεγκρινών και οι πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες. Η πρώτη επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων και του υπενδοθηλιακού χώρου γίνεται μέσω του υποδοχέα GPIb-IX-V ο οποίος αναγνωρίζει τον vWF που εκκρίνεται από τα ECs από τα σωματίδια Weibel Palade καθώς και από τα ακοκκία των αιμοπεταλίων. Η σταθεροποίηση της αρχικής αυτής ασθενούς πρόσδεσης γίνεται με πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μέσω του υποδογέα GPIa/IIa, στη βιτρονεκτίνη (διαμέσου του $\alpha_V\beta_3$), στη φιβρονεκτίνη (διαμέσου του GPIc/IIa) και στη λαμινίνη (διαμέσου του $\alpha_6\beta_1$) [11]. Η δέσμευση του κολλαγόνου από τον GPIa/IIa οδηγεί στην ενεργοποίηση και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Στην ενεργοποίηση αυτή συμμετέχουν και άλλοι αγωνιστές εκτός του κολλαγόνου, όπως η θρομβίνη, το TxA2. το ADP και ο PAF που εκκρίνονται από τα ίδια τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Αυτή η έκκριση έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων αιμοπεταλίων που δεν είχαν αρχικά ενεργοποιηθεί. Στην έναρξη της διαδικασίας της θρόμβωσης φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο και η συνεργιστική αλληλεπίδραση των προσκολλητικών μορίων [153]. Το τελικό στάδιο της προσκόλλησης συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια κατανέμονται κατά μήκος του υπενδοθηλίου και στεγανοποιούν την εκτεθειμένη περιοχή του ενδοθηλίου από την έξοδο του αίματος.

Συσσώρευση των αιμοπεταλίων και σχηματισμός θρόμβου

Συσσώρευση είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο αιμοπετάλια προσκολλώνται μεταξύ τους. Μεταξύ όλων των γλυκοπρωτεϊνών-υποδοχέων, ο υποδοχέας α_{IIb}β₃ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων, αφού παίζει τον κύριο ρόλο στο τελικό στάδιο συσσώρευσης τους. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ανεξάρτητα από τον ενεργοποιητή που την προκαλεί πραγματοποιείται με τη πρόσδεση μορίων ινωδογόνου (Fg) στον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Όταν αυτός είναι ανενεργός το διαλυτό Fg του πλάσματος δε μπορεί να δεσμευτεί στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η πρόσδεση αυτή απαιτεί την παρουσία Ca⁺²

Αιμοπετάλια

και δεν επιτυγχάνεται απουσία δισθενών κατιόντων. Για να επιτευχθεί συσσώρευση απαιτείται κατανάλωση ενέργειας και κίνηση των αιμοπεταλίων. Σπουδαίο ρόλο παίζουν και οι τοιχωματικές διατμητικές δυνάμεις (shear stress) που αναπτύσσονται στην περιοχή της βλάβης οι οποίες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια αν και οι μηχανισμοί αυτής της δράσης είναι ακόμη υπό διερεύνηση [48].

Τα γεγονότα μεταγωγής σήματος τα οποία αρχίζουν μετά τη διέγερση των αιμοπεταλίων και προκαλούν την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή αυτού από υποδοχέα χαμηλής σε υποδοχέα υψηλής συγγένειας. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό με τον όρο μέσα-έξω σηματοδότηση. Ο υποδοχέας α_{Πb}β₃ σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται σε μια μορφή χαμηλής συγγένειας με το Fg, όπου η β₃ υπομονάδα δεν μπορεί να δεσμευτεί με τον προσδέτη. Παράλληλα, η β₃ υπομονάδα παρεμποδίζει την περιοχή δέσμευσης της υπομονάδας α_{IIb} [154]. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η β₃ υπομονάδα υφίσταται αλλαγή διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα την έκφραση της περιοχής δέσμευσης για την RGD (Arg-Gly-Asp) ακολουθία των διαφόρων προσκολλητικών μορίων. Η αλλαγή διαμόρφωσης της β₃ υπομονάδας και η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση του αιμοπεταλίου προκαλεί την έκθεση, στην επιφάνεια, της περιοχής δέσμευσης της υπομονάδας α_{IIb}, με αποτέλεσμα την πρόσδεση του Fg στον υποδογέα α_{Ib}β₃. Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδογέα οδηγεί όχι μόνο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και στην παραγωγή μιας έξω-μέσα σηματοδότησης, αντιδράσεις φωσφορυλίωσης οποία προκαλεί και ανασυγκρότησης η του κυτταροσκελετού [155, 156]. Αποτέλεσμα της δέσμευσης του προσδέτη στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι η ρύθμιση και η σταθεροποίηση των αιμοπεταλίων, η εξάπλωσή τους, η αποκοκκίωση τους, η συρρίκνωση του θρόμβου και πιθανώς η αύξηση της θρομβογόνου ικανότητας του αιμοπεταλίου [157]. Συνοψίζοντας, η παρουσία αγωνιστών όπως το ADP, η θρομβίνη, και το κολλαγόνο προκαλεί τη μέσα-έξω σηματοδότηση που δημιουργείται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τελικά η ενεργοποίηση οδηγεί σε κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση των αιμοπεταλίων, αύξηση του [Ca²⁺]_i, την αποκκοκίωση των πυκνών και α-κοκκίων, τη μείωση των επιπέδων του cAMP και τη μηαντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει πολλές οδούς σηματοδότησης, αλλαγής σχήματος του κυτταροσκελετού, σχηματισμού γεφυρών Fg μεταξύ τους με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

Αιμοπετάλια

Διακρίνονται δύο φάσεις συσσώρευσης, η πρωτογενής συσσώρευση που είναι αντιστρέψιμη και η μη αντιστρεπτή δευτερογενής συσσώρευση. Στην πρωτογενή συσσώρευση τα αιμοπετάλια με τη βοήθεια γεφυρών ινωδογόνου συνδέονται χαλαρά μεταξύ τους. Στην δευτερογενή συσσώρευση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Σε ασθενείς με δυσλειτουργία στην έκκριση των αποθηκευτικών κοκκίων, η δευτερογενής συσσώρευση είναι ελαττωμένη ή απουσιάζει τελείως, κάτι που οδηγεί σε αιμορραγικές διαταραχές [158].

Το πρωτογενές συσσώρευμα που σχηματίζεται είναι σχετικά ασταθές και συνεπώς είναι απαραίτητη η σταθεροποίηση του θρόμβου των αιμοπεταλίων, γεγονός που πραγματοποιείται με τη διαδικασία της δευτερογενούς αιμόστασης, η οποία ξεκινά με την ενεργοποίηση της αλληλουχίας της πήξης και το σχηματισμό της θρομβίνης και του ινώδους [159]. Επιπλέον, κατά την προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε τραυματισμένες περιοχές του ενδοθηλίου, οι ενεργοποιητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια βοηθούν στη στρατολόγηση άλλων κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την επέκταση και τη σταθεροποίηση της αυτούς [160]. Σε αιμοστατικής πλάκας τους παράγοντες ενεργοποίησης συμπεριλαμβάνονται το ADP, το TxA₂, η σεροτονίνη, το κολλαγόνο και η θρομβίνη [161]. Από αυτούς, ο πιο ισχυρός είναι η θρομβίνη [162, 163]. Η θρομβίνη παράγεται τοπικά στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από τον TF και διαμεσολαβεί στην παραγωγή του ινώδους από το ινωδογόνο, το οποίο συμβάλει στο σχηματισμό της αιμοστατικής πλάκας και στην ανάπτυξη του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Επιπλέον, η θρομβίνη ενεργοποιεί απευθείας τα αιμοπετάλια μέσω της διέγερσης του υποδογέα τους PAR-1 [161]. Επίσης, η απελευθέρωση του ADP και του TxA₂ από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, προκαλεί πέραν της στρατολόγησης, την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, την έκφραση διαφόρων προφλεγμονωδών μορίων (όπως είναι η Pσελεκτίνη, ή το CD40L), την αύξηση της προθρομβωτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων και την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, από χαμηλής σε υψηλής συγγένειας. Αποτέλεσμα αυτών, είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός θρόμβου (Εικόνα 1.7) [160, 161, 164].



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων προσκόλλησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο (Τροποποιημένο από Jackson S.P., et al.) [164].

Ο σχηματισμός του θρόμβου πραγματοποιείται σε τρία στάδια: (α) την αρχική φάση που περιλαμβάνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, (β) την φάση της επέκτασης στην οποία συμπεριλαμβάνονται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η στρατολόγηση άλλων αιμοπεταλίων και η συσσώρευσή τους και τέλος, (γ) τη φάση της διαιώνισης που χαρακτηρίζεται από τη διέγερση των αιμοπεταλίων και τη σταθεροποίηση του θρόμβου.

Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs)

Ορισμός

Τα PMPs είναι μικροσκοπικά μεμβρανικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους και εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα χαρακτηριστικά των κυττάρων προέλευσής τους. Εξαιτίας του πολύ μικρού τους μεγέθους δεν ανιχνεύονται με τις κλασσικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα αιμοπετάλια. Οι

Αιμοπετάλια

κυριότεροι τρόποι μελέτης των PMPs είναι με κυτταρομετρία ροής και με ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (μέθοδος ELISA). Τα PMPs απέκτησαν κλινική σημασία αφού εκφράζουν φωσφολιπίδια στην επιφάνειά τους προσδίδοντάς τους έναν προθρομβωτικό χαρακτήρα [165].

Στη διεθνή επιστημονική κοινότητα έχει προταθεί ότι αν ένας μικρού μεγέθους πληθυσμός σωματιδίων (μέχρι 1 μm) εκφράζει θετικότητα για την αννεξίνη-V τότε τα σωματίδια αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως μικροσωματίδια (MPs). Είναι γνωστό ότι, η αννεξίνη-V είναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τον πλακούντα και η οποία εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση δεσμευόμενη με αρνητικά φωσφολιπίδια, διαμέσου γεφυρών Ca²⁺ [166]. Τα PMPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση, περιέχουν μεγάλη ποσότητα PS στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επιφανειακή έκφραση της PS είναι το κύριο χαρακτηριστικό των PMPs. Η θετικότητα προς την αννεξίνη-V όμως δεν είναι επαρκές στοιχείο ώστε να χαρακτηριστούν τα σωματίδια αυτά ως PMPs. Πρέπει τα σωματίδια αυτά να εκφράζουν και άλλες πρωτεΐνες χαρακτηριστικές των κυττάρων προέλευσής τους [167, 168].

Κυτταρικά MPs παράγονται από διάφορα κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα, τα ECs, τα αιμοπετάλια, τα SMCs κ.α. μετά από ενεργοποίησή τους μέσω αγωνιστών ή κατά την απόπτωση. Βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος υγιών ανθρώπων και τα επίπεδά τους αυξάνονται σε πολλές ασθένειες, ιδιαίτερα σε αυτές με υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης. Μεταξύ των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, τα PMPs αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό. Εξαιτίας της σύστασής τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως στη θρόμβωση, στη φλεγμονή, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στην αγγειογένεση [165].

Γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση

Τα PMPs αποτελούν το 70%-90% των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος [169, 170], ενώ δεν έχουν ανιχνευτεί στις αθηρωματικές πλάκες [171]. Τα PMPs είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυστιδίων που ποικίλλουν ως προς το μέγεθος (0.1-1 μm), την πρωτεϊνική και λιπιδιακή τους σύσταση και έχουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια κυρίως την PS στην επιφάνειά τους [172, 173]. Παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές όπως το κολλαγόνο, τη θρομβίνη, το Ca²⁺-ιονοφόρο (A23187) κ.λ.π. [174]. Στην επιφάνεια των PMPs βρίσκονται

μόρια που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη α_{IIb} β_3 [175], η P-σελεκτίνη [176], το CD36 [177], το CD40L [165, 178], το CD31 [179, 180], κ.τ.λ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs)

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη και η διατήρηση του αγγειακού συστήματος εξαρτάται τόσο από το σχηματισμό των νέων αγγείων, όσο και από τη συνεχή ανανέωση του αγγειακού δικτύου. Αυτή η αναγέννηση είναι το αποτέλεσμα, το οποίο προκύπτει από τις μεταβολές των επιπέδων που προκαλούν οι αυξητικοί παράγοντες, καθώς και από τις αιμοδυναμικές συνθήκες στα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι, ο σχηματισμός των νέων τριχοειδών αγγείων και δικτύων τους δεν εξαρτάται μόνο από τα ECs που ήδη υπάρχουν, αλλά επίσης και από τη στρατολόγηση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) που προέρχονται κυρίως από το BM. Στην εικόνα 2.1 φαίνεται το χαρακτηριστικό σχήμα και η ανατομία του αιμοφόρου αγγείου.



Εικόνα 2.1: Ανατομία αιμοφόρου αγγείου.

Το ενδοθήλιο είναι μια λεπτή στοιβάδα κυττάρων, η οποία καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, σχηματίζοντας έτσι διακριτά όρια ανάμεσα στο αγγειακό τοίχωμα και στο αίμα που κυκλοφορεί. Ο ενδοθηλιακός ιστός είναι ένα είδος επιθηλιακού ιστού, ο οποίος καλύπτει τα αγγεία. Το αγγειακό ενδοθήλιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς δεν είναι μόνο ένα αυτοκρινές/παρακρινές όργανο. Το ενδοθήλιο δεν ρυθμίζει μόνο τη συστολή του αγγειακού τοιχώματος και την κυτταρική μεταφορά από το αίμα στο αγγείο, αλλά επίσης λειτουργεί ως ένας κυτταρική μεταφορά από το αίμα στο αγγείο, αλλά επίσης λειτουργεί ως ένας κυτταρικός και ορμονικός διαμεσολαβητής για το αγγειακό τοίχωμα και τα κύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Όπως αναφέρθηκε, η έσω στοιβάδα των αιμοφόρων αγγείων αποτελείται από ECs. Τα ECs εκκρίνουν ένα σημαντικό αριθμό παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω βιολογικές αποκρίσεις μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών. Αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου και προάγουν χημειοτακτικές αποκρίσεις, όπως είναι η φλεγμονή και ο θρόμβος του αίματος [181-183].

Η διατήρηση της στοιβάδας των ECs είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του αγγείου και την παρεμπόδιση των αγγειακών δυσλειτουργιών, όπως είναι η Παρόλο αθηροσκλήρωση [184, 185]. που το ενδοθήλιο διαθέτει ισχυρούς αντιοξειδωτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, παρατεταμένη η και επαναλαμβανόμενη έκθεση του ενδοθηλίου στο οξειδωτικό στρες, που συνδέεται με τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, μειώνει σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα αυτών των προστατευτικών μηγανισμών. Συνεπώς, οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να οδηγήσουν όχι μόνο σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αλλά και σε βλάβη των ECs. Είναι γνωστό ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι ένα από τα αρχικά γαρακτηριστικά στάδια στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η αντικατάσταση των ECs που έχουν υποστεί βλάβη μπορεί να συμβεί μέσω της διαίρεσης των γειτονικών ECs. Ένας εναλλακτικός τρόπος αποκατάστασης του δυσλειτουργικού ενδοθηλίου βρέθηκε ότι είναι τα EPCs που είναι στην κυκλοφορία [183].

Στην εικόνα 2.2 φαίνεται η προέλευση των εμβρυονικών EPCs. Η ιεραρχία των εμβρυονικών και των ενήλικων EPCs υπέδειξε ότι τα ενδοθηλιακά και τα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από ένα κοινό πρόδρομο κύτταρο, τον αιμαγγειοβλάστη. Η προέλευση του αιμαγγειοβλάστη είναι η μεσοδερμική μικροβιακή στοιβάδα των επιβλαστών, η οποία διαιρείται ασυμμετρικά για να σχηματίσει αγγειοβλάστες ή πολυδύναμα HSCs. Τα HSCs, όπως είναι τα CD34⁺ κύτταρα είναι πιθανώς η πιο απλή

EPCs

διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιμοπεταλίων [9]. Μία από τις πρώτες μελέτες έδειξε ότι μπορεί να υπάρξει παραγωγή αιμοπεταλίων *ex vivo* από τα HSCs, όπου λειτουργικά αιμοπετάλια μπορεί να προέλθουν από περιφερικά CD34⁺ κύτταρα παρουσία TPO και ανθρώπινου πλάσματος [186]. Διάφορες άλλες πηγές των HSCs που έχουν βρεθεί ότι μπορούν να παράγουν αιμοπετάλια μέσω καλλιέργειας είναι το περιφερικό αίμα (PB) [187], ο BM [188], καθώς και το αίμα που προέρχεται από τον ομφάλιο λώρο (CB) [189, 190]. Τέλος, όπως φαίνεται από την εικόνα 1.2, τα EPCs έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ECs.



Εικόνα 2.2: Διαφοροποίηση αιμαγγειοβλάστη προς HSCs και EPCs.

Διαφορά μεταξύ βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων

Ένα ενήλικο βλαστικό κύτταρο είναι ένα αδιαφοροποίητο και μη εξειδικευμένο κύτταρο που βρίσκεται ανάμεσα στα διαφοροποιημένα κύτταρα ενός ιστού ή οργάνου. Το βλαστικό κύτταρο έχει την ικανότητα να ανανεώνεται από μόνο του και να διαφοροποιείται σε εξειδικευμένα είδη κυττάρων του ιστού ή του οργάνου. Το προϊόν ενός βλαστικού κυττάρου που υφίσταται διαίρεση είναι τουλάχιστον ένα επιπλέον βλαστικό κύτταρο, το οποίο παρουσιάζει τις ίδιες ικανότητες με το μητρικό κύτταρο. Στην εικόνα

2.3 απεικονίζεται ένα HSC το οποίο παράγει ένα βλαστικό κύτταρο δεύτερης γενιάς καθώς και ένα νευρώνα. Γενικά, ο πρωταρχικός ρόλος των ενήλικων βλαστικών κυττάρων σε έναν ζωντανό οργανισμό είναι η διατήρηση και η επιδιόρθωση του ιστού, στον οποίο αυτά βρίσκονται [191]. Από την άλλη πλευρά, τα πρόδρομα κύτταρα γενικά είναι πολυδύναμα παράγωγα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Τα πρόδρομα κύτταρα έχουν μια παρόμοια δομή με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, τα πρόδρομα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα της αντιγραφής ή αυτοανανέωσης. Επίσης, ένα πρόδρομο κύτταρο είναι μη εξειδικευμένο ή εμφανίζει μερικά χαρακτηριστικά ενός εξειδικευμένου κυττάρου, το οποίο είναι ικανό να υποστεί κυτταρική διαίρεση και να αποδώσει δύο εξειδικευμένα κύτταρα. Στην εικόνα 2.3 ένα μυελοειδές πρόδρομο κύτταρο μετά τη διαίρεση αποδίδει δύο εξειδικευμένα κύτταρα (ένα ουδετερόφιλο και ένα ερυθρό αιμοσφαίριο). Τα πρόδρομα κύτταρα εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς, όπως η καρδιά, οι μύες, το λίπος και το δέρμα. [192-194].



Εικόνα 2.3: Διαφοροποίηση ενός βλαστικού και ενός πρόδρομου κυττάρου.

EPCs

μια μικρή πηγή βλαστικών κυττάρων, τα οποία είναι εξειδικευμένα για τον ιστό. Εντούτοις, αν μια βλάβη λάβει χώρα, αυτή η μικρή πηγή δεν μπορεί πλέον να παράγει ικανοποιητικές ποσότητες των κυττάρων που είναι εξειδικευμένα για τους ιστούς. Σε αυτή την κατάσταση, τα βλαστικά/πρόδρομα κύτταρα μπορεί να κινητοποιηθούν από το BM (κεντρική πηγή) και να κατευθυνθούν στον τραυματισμένο ιστό ή όργανο [192].

Ορισμός και προέλευση των EPCs

Ο ορισμός των EPCs είναι σύνθετος εξαιτίας της έλλειψης ενός μοναδικού εξειδικευμένου δείκτη για τα συγκεκριμένα κύτταρα [195-199]. Έχει βρεθεί ότι, τα EPCs είναι ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ECs εάν ανώτερα κύτταρα αναδιοργανωθούν ή αυξημένο οξειδωτικό στρες λάβει χώρα [184, 200]. Για αυτό, τα EPCs μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας της ενδοθηλιακής στοιβάδας στο αγγειακό δίκτυο. Επίσης, διαφοροποιούνται in vitro σε SMCs. Έτσι, τα EPCs είναι ένας κυτταρικός πληθυσμός, προερχόμενος κυρίως από το μυελό των οστών (BM), από κύτταρα που δεν είναι αυτό ήταν γνωστά ως αγγειοβλάστες (εμβρυονικά EPCs) (εικόνα 2.2). Αυτά τα κύτταρα προέρχονται από εμβρυονικά μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται σε ώριμα ECs και συμμετέχουν στο σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων, δηλαδή στην αγγειογένεση.

Τα EPCs όταν πολλαπλασιάζονται ex vivo μπορούν να απομονωθούν από το PB [201-203] και συγκεκριμένα τα μονοπύρηνα κύτταρα (MNCs) και τα μυελοειδή κύτταρα. Επιπλέον, τα EPCs εντοπίζονται στο BM [201, 204-206], στο CB [207-210], καθώς επίσης και στο εμβρυϊκό ήπαρ και λίπος [211, 212]. Τέλος, τα EPCs μπορεί να προέλθουν από την περιοχή που είναι ανάμεσα στον λείο μυ και τη μέση στοιβάδα του αγγειακού τοιχώματος στους ενήλικες ανθρώπους [213-215]. Οι κλασσικοί μέθοδοι απομόνωσης περιλαμβάνουν κυρίως καλλιέργειες προσκόλλησης των MNCs από PB και CB καθώς και τη χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων τα οποία είναι επικαλυμμένα με διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα (anti-CD133, anti-CD34, anti-CD14 ή anti-CD146) [216].

Μελέτη έδειξε ότι, τα EPCs που προέρχονται από τα MNCs του PB (PB-MNCs) φαίνεται να έχουν μειωμένη ικανότητα εξάπλωσης σε σύγκριση με τα EPCs που προέρχονται από τα ενήλικα HSCs ή τα MNCs από το CB (CB-MNCs) [217]. Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι, η αγγειακή ζώνη niche του BM είναι η κύρια τοποθεσία των EPCs. Από το BM, τα EPCs μπορούν να κατευθυνθούν προς άλλα όργανα, όπου εκεί τα κύτταρα προκαλούν το σχηματισμό νέων αγγείων, την καρδιακή αναγέννηση και την επιδιόρθωση των αγγείων.



Εικόνα 2.4: Προέλευση και κατάληξη των EPCs.

Στην εικόνα 2.4 φαίνεται ξεκάθαρα η προέλευση και η κατάληξη των ενήλικων ανθρώπινων EPCs, που προέρχονται από τον BM, με σημαντικούς επιφανειακούς δείκτες. Το αίμα που προέρχεται από τον BM είναι μια πλούσια πηγή για τα EPCs. Τα μυελοειδή κύτταρα στο PB μπορούν να διαφοροποιηθούν σε EPCs. Τα HSCs μπορούν να αποδιαφοροποιηθούν στον BM για να σχηματιστούν οι αιμαγγειοβλάστες. Επιπλέον, υπάρχει το τελικό στάδιο ωριμότητας των EPCs σε ECs. Τα μεσεγχυματικά πρόδρομα κύτταρα, τα κύτταρα που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό, τα πρόδρομα καρδιακά και όλα τα είδη των νευρικών κυττάρων σχηματίζουν ώριμα ECs.

EPCs

Στην εικόνα 2.5 απεικονίζεται η διαφοροποίηση των HSCs και μη αιμοποιητικών κυττάρων σε EPCs. Ο μυελός των οστών περιέχει πολυδύναμα ενήλικα πρόδρομα κύτταρα (MAPCs), τα οποία όπως και το όνομά τους υποδηλώνει, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων ανάμεσα στους οποίους είναι και τα ECs. Ο BM είναι η "δεξαμενή" των EPCs, όπου αυτά αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1% των συνολικών κυττάρων του BM και λιγότερο από το 0,01% των MNCs στο PB κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [214]. Τα EPCs είναι εξαιρετικά σπάνια στο περιφερικό αίμα των ενηλίκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι σημαντικός παράγοντας για την έλλειψη σαφώς αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό και την απομόνωση των κυττάρων [213, 218].



Εικόνα 2.5: Προέλευση των EPCs (τροποποιημένο από Smadja D.M., et al.) [216].

Φαινότυπος των EPCs

Τα EPCs εκφράζουν διάφορους εξειδικευμένους δείκτες στην επιφάνεια των κυττάρων, όπως τα μόρια συμπλέγματος διαφοροποίησης CD34 και CD133/AC133, καθώς και τον υποδοχέα 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR-2/KDR) [184, 200, 219]. Εργαστηριακές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι τα EPCs παρουσιάζουν πολυάριθμα χαρακτηριστικά που υπάρχουν και στα ECs.

Το αντιγόνο CD34 αρχικά ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία στόχευαν σε ένα δείκτη ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια και είναι κοινός σε πολλά αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα (HPCs) [220-222]. Η πρωτεΐνη CD34 είναι ουσιαστικά το κύριο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών CD34, όπου ανήκουν επίσης η ποδοκαλυξίνη και η ενδογλυκάνη βάσει των συντηρημένων δομικών περιοχών και της γονιδιακής οργάνωσής τους [223, 224]. Παρόλο που αυτές οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν παρόμοια δομή, το CD34 είναι το μοναδικό μέλος από τα τρία που συνήθως έχει κλινική εφαρμογή για την ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων.

Δομικά, το CD34 είναι μια πρωτεΐνη η οποία περιέχει μια απλή διαμεμβρανική έλικα στην οποία το εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο είναι πολύ μεγαλύτερο από το ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Επίσης, το CD34 είναι το μικρότερο σε μέγεθος συγκριτικά με τα άλλα δύο μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας πρωτεϊνών (Εικόνα 2.6). Η αμινοτελική περιοχή περιέχει πολλά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και προλίνης τα οποία είναι Ο-γλυκοζυλιωμένα και σιαλυλιωμένα και περιέχουν πιθανές Νγλυκοζυλιωμένες θέσεις. Το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή η οποία περιλαμβάνει μια κυστεΐνη, ενώ το καρβοζυτελικό άκρο του CD34 περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης [220, 223]. Παρά την καλά προσδιορισμένη δομή και τη χρησιμότητά του στην ταυτοποίηση των HSCs, οι κύριες κυτταρικές λειτουργίες του αντιγόνου CD34 παραμένουν υπό διερεύνηση. Επιπλέον, από έρευνες που έχουν γίνει προκύπτει ότι η πρωτεΐνη CD34 έχει διάφορους ρόλους.

Συνοπτικά, το συγκεκριμένο αντιγόνο λαμβάνει μέρος στις παρακάτω διαδικασίες: α) Προάγει τον πολλαπλασιασμό των HPCs [225].

β) Προάγει την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο διαμέσου της δέσμευσης στην L-σελεκτίνη [226], όπως επίσης και τη βελτίωση της κυτταρικής προσκόλλησης [227-229].

γ) Εμποδίζει την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και διαδραματίζει πιθανώς ρόλο στη στερεοχημική παρεμπόδιση της μεσολαβούμενης από την ιντεγκρίνη προσκόλλησης των HSCs [224].

δ) Διαδραματίζει ρόλο στην αιμοποίηση [225] και τέλος,

ε) Συμμετέχει στη μεταφορά των αιμοποιητικών κυττάρων [230, 231].



Εικόνα 2.6: Δομή της οικογένειας των CD34 πρωτεϊνών (τροποποιημένο από Nielsen J.S., et al.) [223].

Παρόλο που η εξειδικευμένη λειτουργία του αντιγόνου CD34 δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, το προφίλ έκφρασης του είναι γνωστό στους ενήλικες. Είναι γνωστό ότι, το CD34 είναι μια Ο-γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και συγκεκριμένα σιαλομυκίνη με δομή ενιαίας αλυσίδας 105-120 kDa που εκφράζεται κυρίως στα HPCs και στα HSCs. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, το CD34 εκφράζεται επίσης στο αγγειακό ενδοθήλιο στα περισσότερα όργανα, σε μερικούς ιστικούς

ινοβλάστες και εντοπίζεται σε μεγάλη αφθονία στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο συγκεκριμένων μικρών αγγείων, αλλά όχι σε αγγεία μεγάλου μεγέθους [196, 232-235]. Το ενδοκυττάριο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης CD34 υπόκειται σε φωσφορυλίωση μέσω της ενεργοποιημένης πρωτεΐνικής κινάσης C, υποδηλώνοντας ότι το CD34 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση διαφόρων ουσιών στο ενδοθήλιο [236-238]. Τέλος, το CD34 πιθανώς λειτουργεί ως μόριο προσκόλλησης στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν ανάμεσα στα ECs και στα HPCs, ενώ η έλλειψή του προκαλεί διαταραχές στα αγγεία και στη διαδικασία της αιμοποίησης [225].

Η πρωτεΐνη KDR είναι ο κύριος υποδοχέας ο οποίος επάγει σήματα στα ECs με τη δέσμευση είτε του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του VEGF-C, είτε του VEGF-D [239]. Το KDR είναι κινάση της τυροσίνης, η οποία δεσμεύεται στον VEGF με υψηλή συγγένεια, οπότε μεταδίδονται τα σήματα στα ECs. Ακόμη συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, βλάστηση, μετανάστευση και στο σχηματισμό σωλήνων. Το KDR επίσης εκφράζεται και σε άλλα είδη κυττάρων εκτός από τα ECs, όπως είναι τα πρώιμα μη δεσμευμένα βλαστικά κύτταρα [196, 240, 241].

Είναι γνωστό ότι, ο VEGF είναι μια σημαντική σηματοδοτική πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αγγειογένεση. Όπως και το όνομά του υποδηλώνει, η ενεργότητα του VEGF περιορίζεται κυρίως στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, παρόλο που αυτή επηρεάζει και περιορισμένο αριθμό άλλων κυτταρικών τύπων (διέγερση μονοκυττάρων/μετανάστευση μακροφάγων). Έχει αποδειχθεί ότι, ο VEGF διεγείρει τη μιτογένεση των ECs και τη μετανάστευση των κυττάρων in vitro. Επιπλέον, βελτιώνει τη μικροαγγειακή διαπερατότητα και μερικές φορές αναφέρεται ως αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας. Όλα τα μέλη της οικογένειας του VEGF διεγείρουν κυτταρικές αποκρίσεις όταν δεσμευτούν στους υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης στην κυτταρική επιφάνεια, οδηγώντας έτσι στο διμερισμό και στην ενεργοποίησή τους μέσω της διαδικασίας της αποφωσφορυλίωσης. Οι υποδοχείς του VEGF, όπως και το KDR έχουν ένα εξωκυττάριο τμήμα που αποτελείται από 7 περιοχές με δομή παρόμοια με αυτή των ανοσοσφαιρινών, μια απλή διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει την περιοχή κινάσης της τυροσίνης (εικόνα 2.7). Ο VEGF-A δεσμεύεται στον VEGFR-1 (Flt-1) και VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Ο VEGFR-2 πραγματοποιεί όλες σχεδόν τις γνωστές κυτταρικές αποκρίσεις προς τον VEGF. Η λειτουργία του VEGFR-1 δεν είναι καλά προσδιορισμένη, αν και πιστεύεται ότι ρυθμίζει τη σηματοδότηση του VEGFR-2 [242, 243].



Εικόνα 2.7: Κατηγορίες του VEGF και των υποδοχέων του.

Το CD133 (επίσης γνωστό ως AC133 στους ανθρώπους) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 120 kDa που δεσμεύει επιλεκτικά χοληστερόλη και εκφράζεται αποκλειστικά στα HSCs και στα πρόδρομα κύτταρα [196, 244]. Επιπλέον, το CD133 ονομάζεται αλλιώς προμινίνη-1 καθώς ήταν η πρώτη πρωτεΐνη, η οποία ταυτοποιήθηκε ως "προμινίνη". Προτάθηκε ένα δομικό μοντέλο του αντιγόνου CD133, στο οποίο η πρωτεΐνη αποτελείται από ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, ένα κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο, δύο μικρούς κυτταροπλασματικούς βρόγχους πλούσιους σε κυστεΐνη και δύο πολύ μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους, όπου ο καθένας περιέχει τέσσερις πιθανές θέσεις για Ν-γλυκοζυλίωση (Εικόνα 2.8) [245-247]. Έχει αποδειχθεί ότι, τα CD133⁺ κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διάφορους φαινότυπους [248].

Ο Yin και οι συνεργάτες του κατόρθωσαν να παρασκευάσουν ένα νέο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο ήταν ικανό να αναγνωρίσει τον επίτοπο AC133 του CD133 [244]. Αυτός ο επίτοπος παρουσίασε έκφραση σε πληθυσμούς των CD34⁺ πρόδρομων κυττάρων, στο BM, στο αίμα ενηλίκων και στα κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος. Για αυτό το λόγο, το CD133 προτάθηκε ως δείκτης των HPCs [249, 250]. Με τον σαφή προσδιορισμό του αντιγόνου AC133 δεν σημαίνει ότι μπορεί να ταυτοποιηθεί και το CD133, αφού το μονοκλωνικό αντίσωμα AC133 δεσμεύεται μόνο στο γλυκοζυλιωμένο επίτοπο του CD133.



Εικόνα 2.8: Δομή της γλυκοπρωτεΐνης CD133 [247].

Ταυτοποίηση των EPCs

Στη διεθνή επιστημονική κοινότητα, όπως έχει αναφερθεί δεν έχει αναπτυγθεί ακόμη μια εξειδικευμένη και ευαίσθητη μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των EPCs. Εντούτοις, αρχικά μπορεί να ειπωθεί ότι, τα κυκλοφορούντα EPCs μπορεί να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τα αιμοποιητικής (hEPCs) και τα μη αιμοποιητικής προέλευσης (non-hEPCs) EPCs (Εικόνα 2.9) [198, 251]. Τα hEPCs προέρχονται από τον BM και αποτελούν έναν υποπληθυσμό των HSCs με προαγγειογόνα χαρακτηριστικά [251-254]. Τα hEPCs μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία ως κυτταρικά συστατικά του αίματος, συνθέτοντας έναν ενδεχομένως ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό. Ο ανομοιογενής πληθυσμός αποτελείται από EPCs τα οποία έχουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (CFU-Hill ή CFUs), καθώς και κύτταρα τα οποία δεν σχηματίζουν αποικίες, όπως τα μυελοειδή και τα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs). Τα non-hEPCs που είναι τα προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs, EOCs ή ECFCs) είναι κύτταρα τα οποία δεν προέργονται από τα HSCs και απομονώνονται από δείγματα αίματος ή ιστών διαμέσου διαδοχικών καλλιεργειών. Τα non-hEPCs θεωρούνται σημαντικά λόγω του ότι παρουσιάζουν φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των ECs [255] ή μπορούν να διαφοροποιηθούν σε φαινότυπο ίδιο με αυτό των ECs [256]. Η προέλευση των non-hEPCs παραμένει υπό διερεύνηση, αλλά πιστεύεται ότι αυτά προέρχονται περισσότερο από τα βλαστικά κύτταρα του BM ή τα αιμοφόρα αγγεία οργάνων τα οποία όμως δεν έχουν αιμοποιητικά χαρακτηριστικά παρά από τα HSCs [257].

EPCs



Εικόνα 2.9: Πιθανή κατηγοριοποίηση των EPCs που είναι στην κυκλοφορία σε hEPCs και nonhEPCs [251].

Παρόλα αυτά, δύο διαφορετικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται για την απομόνωσή και τον προσδιορισμό τους: α) η επιλογή υποπληθυσμών βασισμένη σε αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων χρησιμοποιώντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και β) η κυτταρική καλλιέργεια, όπου οι πιθανοί πληθυσμοί των EPCs είναι τρεις, τα CFU-Hill κύτταρα και τα CACs που ονομάζονται αλλιώς πρώιμα EPCs (early EPCs) και τέλος τα OECs (late EPCs) [258, 259].

α) Κυτταρομετρία ροής

Η άμεση απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών χρησιμοποιώντας τα επιφανειακά αντιγόνα παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορούν να επιλεχθούν συγκεκριμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί. Τα επιφανειακά αντιγόνα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των EPCs είναι το CD34, το CD133 και το KDR [199, 211, 248, 259-262]. Η μέτρηση των κυττάρων με την κυτταρομετρία ροής βασίζεται στη χρήση επισημασμένων κυττάρων με αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν επιφανειακά ή ενδοκυττάρια αντιγόνα. Χρησιμοποιώντας αντιγόνα που βρίσκονται στην κυτταρική

επιφάνεια ως δείκτες για τον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό των EPCs, δίνεται η δυνατότητα για να γίνει επιλογή ενός αρκετά ομογενοποιημένου πληθυσμού. Εντούτοις, ο ορισμός των EPCs μέσω αυτής της μεθόδου είναι σύνθετος λόγω της απουσίας μοναδικών και εξειδικευμένων δεικτών για τα συγκεκριμένα κύτταρα [259]. Αυτή η μέθοδος έχει δύο σημαντικούς περιορισμούς: πρώτον, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, δεν είναι γνωστός ο ακριβής αντιγονικός φαινότυπος των EPCs κυρίως επειδή αυτός αλληλεπικαλύπτεται με άλλες κυτταρικές σειρές. Για αυτό το λόγο, θεωρείται σωστό να λέμε ότι έχουμε "πιθανά EPCs" (putative EPCs). Η προσπάθεια να χαρακτηριστούν επακριβώς τα EPCs παρουσιάζει δυσκολίες εξαιτίας της σημαντικής αλληλοεπικάλυψης που παρατηρείται ανάμεσα στα επιφανειακά κυτταρικά αντιγόνα τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των πιθανών EPCs και αυτά τα οποία εκφράζονται σε κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης [240, 259, 263, 264]. Για παράδειγμα, ενώ τα αντιγόνα CD34, CD133 και KDR χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των EPCs, είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί ότι αυτά εκφράζονται στα ανθρώπινα HSCs, όπως επίσης και σε διάφορους υποπληθυσμούς των HPCs [240, 248, 259, 263-268]. Δεύτερον, μια πιθανή λειτουργία των EPCs αποδίδεται σε ένα σχετικά απλό αντιγονικό φαινότυπο. Πράγματι, όταν διεξάγεται κυτταρομετρία ροής σε φρέσκο PB, ο πολύ μικρός αριθμός των EPCs που εντοπίζεται στην κυκλοφορία καθιστά αδύνατη τη χρήση σημαντικού αριθμού επιφανειακών αντιγόνων. Έτσι, μπορεί να ισχυριστεί ότι ένας κυτταρικός πληθυσμός με περίπλοκη λειτουργία είναι σχεδόν αδύνατον να ταυτοποιηθεί πλήρως μέσω ενός φαινοτύπου ο οποίος βασίζεται σε 2-3 αντιγόνα. Παρά όμως τους όποιους σημαντικούς περιορισμούς, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να θεωρηθεί η καλύτερη μέθοδος προκειμένου να αποκτηθούν ποσοτικά δεδομένα σχετικά με τους πιθανούς πληθυσμούς των EPCs. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευαίσθητη, εξειδικευμένη και αναπαραγώγιμη, οπότε μπορεί να θεωρηθεί ως η μεθοδολογία αναφοράς (gold standard method) όταν η μέτρηση των EPCs του PB χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης σε ασθένειες [196, 199, 269].

Για τον προσδιορισμό του αντιγονικού φαινοτύπου των EPCs σύμφωνα με τον όρο "πρόδρομα ενδοθηλιακά", θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί τουλάχιστον ένας δείκτης που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα είναι ανώριμα/βλαστικά καθώς και ένας τουλάχιστον δείκτης ενδοθηλιακής προέλευσης. Οι πιο κοινοί δείκτες που υποδεικνύουν τον πρόδρομο χαρακτήρα στους ανθρώπους είναι το CD34 και το CD133. Τυπικό ενδοθηλιακό αντιγόνο το οποίο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των EPCs είναι το KDR/Flk-1 (ο υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης στους ανθρώπους και η κινάση-1 του Εμβρυϊκού

Ήπατος στα ποντίκια), το οποίο αντιστοιχεί στον VEGFR-2. Για τον καλύτερο προσδιορισμό και επιπρόσθετο εμπλουτισμό των EPCs, μερικές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν και άλλους δείκτες ή συνδυασμούς διαφόρων αντιγόνων. Ο υποδοχέας του SDF-1, ο υποδοχέας 4 των χημειοκινών CXC (CXCR4), ο οποίος απαιτείται για την εγκατάσταση των αιμοποιητικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθούν κύτταρα με αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης και νεοαγγείωσης [270]. Εντούτοις, η βελτιωμένη λειτουργικότητα αποδόθηκε κυρίως στην αυξημένη εγκατάσταση των CXCR4⁺ κυττάρων και την απελευθέρωση πολλών προαγγειογόνων κυτοκινών. Επιπρόσθετα, κύτταρα και στα ECs, απομονώθηκαν από το PB και το BM εμφανίζοντας υψηλή προαγγειογόνο και αγγειογενετική δράση [271, 272]. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο παράγοντας von Willebrand (vWF).

Προκύπτει ότι, το CD34 και το KDR παρουσιάζουν μια επικαλυπτόμενη έκφραση στα βλαστικά κύτταρα και στα ECs και εκφράζονται σε περιοχές στο μεσόδερμα του εμβρυϊκού σάκου σε πρωτογενείς αιμαγγειοβλάστες κατά τη διάρκεια του αρχικού εμβρυονικού πρώιμου σταδίου της αγγειογένεσης. Τα CD34⁺KDR⁺ κύτταρα είναι ανώριμα με ενδοθηλιακό φαινότυπο και για αυτό αναπαριστούν πιθανά EPCs ή μεταγεννητικούς αιμαγγειοβλάστες [196, 253]. Αυτός ο αντιγονικός προσδιορισμός βρίσκεται σε συμφωνία με την αρχική περιγραφή που έχει γίνει από τον Asahara και τους συνεργάτες του [202], όπου αποδείχθηκε ότι ανθρώπινα κύτταρα από το PB τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την έκφραση του CD34 ή του KDR, διαφοροποιήθηκαν πλήρως σε ώριμα ECs και σχημάτισαν νέα αγγεία in vivo [196, 199]. Σε αντίθεση, το σύνολο των CD34⁺ κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως γενικά πρόδρομα κύτταρα (περισσότερο αιμοποιητικά) και όγι ως EPCs, επειδή μια μειοψηφία αυτών των κυττάρων που είναι στην κυκλοφορία εκφράζουν αντιγόνα ενδοθηλιακής προέλευσης. Έχει γίνει κριτική στο γεγονός ότι, ο φαινότυπος CD34⁺KDR⁺ μπορεί να επικαλύπτεται μερικώς με αυτόν των ώριμων ECs επειδή το CD34 εκφράζεται και σε μικροαγγειακά ενδοθήλια, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Εντούτοις, σε πρωτότυπες μελέτες στις οποίες αναφέρεται η in situ έκφραση του CD34 στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο δεν έλαβαν υπόψη την υπόθεση ότι αυτά τα αγγεία περιλάμβαναν CD34⁺ EPCs. Ο βαθμός της αλληλοεπικάλυψης των φαινοτύπων ανάμεσα στα EPCs και στα κυκλοφορούντα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (CECs) δεν είναι προσδιορισμένος με σαφήνεια επειδή το CD146, το οποίο πιστεύονταν

ότι είναι ένα πολύ εξειδικευμένο αντιγόνο για την ταυτοποίηση των ώριμων ECs [273], εκφράζεται επίσης στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα [196, 274].

Επειδή το CD34 μπορεί επίσης να εκφραστεί από τα ECs, άλλες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν τον πιο ανώριμο δείκτη CD133 για την επιλογή των πιθανών EPCs [248]. Επιπλέον, λόγω του ότι το CD133 δεν εκφράζεται ποτέ στα ώριμα ECs, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα CD133⁺KDR⁺ κύτταρα ανταποκρίνονται καλύτερα στον ορισμό των EPCs. Όμως, το CD133 εκφράζεται σε πιο ανώριμα κύτταρα από ότι το CD34, οπότε τα CD133⁺KDR⁺ είναι πιο σπάνια στην κυκλοφορία σε σύγκριση με τα CD34⁺KDR⁺ κύτταρα σε συνθήκες σταθερής κατάστασης [275]. Παρά αυτούς τους περιορισμούς, οι CD34⁺KDR⁺ και CD133⁺KDR⁺ μπορούν να συμπεριληφθούν ανάμεσα στους πιθανούς αντιγονικούς φαινοτύπους των EPCs. Ο συνδυασμός αυτών των δύο φαινοτύπων, δηλαδή ο φαινότυπος CD34⁺CD133⁺KDR⁺ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για τον προσδιορισμό των EPCs, αλλά τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι τόσο σπάνια στην κυκλοφορία που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν σε μερικούς ανθρώπους (Εικόνα 2.10). Επιπλέον, έγει αναφερθεί ότι τα CD34⁺CD133⁺KDR⁺ κύτταρα περιλαμβάνουν περισσότερο HPCs παρά EPCs λόγω της παρουσίας του CD133 [276] και ότι τα πραγματικά EPCs (true EPCs) δεν προέρχονται από τα CD133⁺ κύτταρα [257]. Όταν αναλυθεί η επιγενετική κατάσταση των CD34⁺ και CD34⁺KDR⁺ κυττάρων, πράγματι τα υψηλά επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA του προαγωγέα της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) και οι τροποποιήσεις της αποσιώπησης των ιστονών διάφορων γονιδίων των ενδοθηλιακών δεικτών υποδεικνύουν ότι αυτά τα κύτταρα δεν είναι προδιατεθειμένα να αποκτήσουν χαρακτηριστικά ενδοθηλιακών κυττάρων απουσία ουσιαστικών επαναπρογραμματισμένων ερεθισμάτων [277].



Εικόνα 2.10: Ένα απλοποιημένο διάγραμμα Venn το οποίο απεικονίζει τις διάφορες ομάδες των διαφορετικών φαινοτύπων των πρόδρομων κυττάρων. Οι συχνότητες των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών έχουν υπολογιστεί σε σχέση με τη μέτρηση των CD34⁺ κυττάρων (έγινε ρύθμιση στο 100) και προέρχονται από μετρήσεις κυττάρων οι οποίες διεξήχθησαν σε 439 συνολικά άτομα, ανάμεσα στους οποίους ήταν υγιείς και ασθενείς με καρδιαγγειακές διαταραχές [196].

Εντούτοις, πολλές ερευνητικές ομάδες έγουν αποδείξει ότι τα CD34⁺ ή τα CD133⁺ κύτταρα τα οποία προέρχονται από το PB, το BM και το CB μπορούν να αναπτύξουν χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα ECs, να εκφράσουν γονίδια ενδοθηλιακών δεικτών και να σχηματίσουν ενδοθηλιακές δομές in vitro και in vivo [199, 278-281]. Ο σημαντικός ρόλος των CD34⁺ κυττάρων αποδεικνύεται επιπλέον από το εύρημα ότι η προαγγειογόνος δράση απουσιάζει στο επιλεγμένο κλάσμα των CD34⁻ κυττάρων [278]. Συνολικά, η ερμηνεία αυτών των ευρημάτων που παρουσιάζουν ασυμφωνία είναι δύσκολη και ουσιαστικά προτείνεται ότι όλα τα CD34⁺ κύτταρα δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως EPCs και/ή οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των κυττάρων μπορεί να επηρεάσουν την επιγενετική τους κατάσταση και τις λειτουργικές τους ιδιότητες [199]. Πράγματι, μερικές μελέτες υπέδειξαν ότι ο υποπληθυσμός των CD34⁺ κυττάρων ο οποίος εμφάνισε συνέκφραση του KDR είναι περισσότερο εμπλουτισμένος σε EPCs [282]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι, τα CD133⁺CD34⁻KDR⁺ κύτταρα συνεισφέρουν στην αναγέννηση των αγγείων και αντιπροσωπεύουν έναν πιο ανώριμο φαινότυπο των EPCs, ο οποίος στη συνέχεια ωριμάζει προς ECs [275]. Τα CD133⁺ κύτταρα δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως EPCs επειδή αυτά αντιπροσωπεύουν περισσότερο τα HPCs και δεν έχουν ενδοθηλιακούς δείκτες. Επιπλέον, παρατηρείται μεγάλη αλληλοεπικάλυψη ανάμεσα στους πληθυσμούς των κυκλοφορούντων CD133⁺ και CD34⁺ [283]. Αξίζει να τονιστεί ότι, τα CD34⁺ κύτταρα που είναι στην κυκλοφορία και εκφράζουν παράλληλα το CD133 και το

KDR είναι ένας λειτουργικά ευδιάκριτος πληθυσμός των EPCs ο οποίος μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στη νεοαγγειογένεση [211].

Η πρόσθεση ενός τέταρτου αντιγόνου θα προσέγγιζε το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου και θα αύξανε σημαντικά τη μεταβλητότητα της. Έτσι, σε μερικές έρευνες μελετήθηκε παράλληλα η συνέκφραση του αντιγόνου CD45 των λευκοκυττάρων [284] και προτάθηκε ότι τα EPCs εντοπίζονται στο CD45⁻ κλάσμα [276]. Το μεγαλύτερο ποσοστό (90%) των CD34⁺ πρόδρομων κυττάρων εκφράζουν CD45 σε χαμηλή ένταση (CD45dim), ενώ λιγότερο από το 10% είναι CD45⁻. Σε μελέτη που έγινε, προέκυψε ότι το CB και ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-SCF) κινητοποίησαν τα CD34⁺KDR⁺ και CD34⁺CD133⁺KDR⁺ κύτταρα του PB, οπότε αναπτύχθηκαν αιμοποιητικές αλλά όχι ενδοθηλιακές αποικίες και ότι ενδεχομένως, ο πληθυσμός των CD34⁺CD45⁻ σχηματίζει ενδοθηλιακές αποικίες *in vitro* [276].

Δεδομένου ότι το CB και το κινητοποιημένο PB είναι εμπλουτισμένα σε HPCs, δεν είναι σαφές σε ποιο βαθμό αυτά τα αποτελέσματα έχουν εφαρμογή επίσης στο PB κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, η σχέση ανάμεσα στα CD34⁺CD45⁻ κύτταρα και στα CECs παραμένει να διευκρινιστεί αναλύοντας δείγματα αίματος που προέρχονται από τη μεταμόσχευση του BM από άντρα σε γυναίκα. Βρέθηκε ότι, μόνο το 5-10% των CD34⁺ κυττάρων που είναι στην κυκλοφορία δεν έχουν προέλευση από το BM και μπορεί να αντιστοιχούν στα CECs [199]. Τέλος, αποδείχθηκε ότι τα CD34⁺KDR⁺ κύτταρα παρουσίασαν καλύτερη συσχέτιση με τη στεφανιαία νόσο (CAD) και απόκριση στη θεραπεία με στατίνες αν περιοριστούν στην CD45dim περιοχή [285]. Για την επιλογή του πιο κατάλληλου φαινοτύπου των EPCs για μια μελέτη, αυτό που πρέπει να προσεγθεί ιδιαιτέρως είναι ότι τα EPCs βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στην κυκλοφορία σε φυσιολογικές συνθήκες. Συνεπώς, προκύπτει η ανάγκη να αυξηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο ο συνολικός αριθμός των κυτταρομετρικών συμβαμάτων, γεγονός το οποίο γενικά δεν είναι αναγκαίο στις περισσότερες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής [269]. Ένας άλλος τρόπος είναι ανάμεσα στους πιθανούς φαινοτύπους των EPCs να επιλεγθεί αυτός που αποδίδει τον υψηλότερο κυτταρικό αριθμό, όπως ο CD34⁺KDR⁺. Αντίθετα, μειωμένοι αριθμοί κυττάρων προκύπτουν από τους φαινότυπους CD133⁺KDR⁺ και $CD34^+CD133^+KDR^+$. Eminléov, o φαινότυπος $CD34^+KDR^+$ έχει αποδειχθεί ότι είναι ανεξάρτητος δείκτης καρδιαγγειακών συμβαμάτων [196, 261, 286].

Συνολικά, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι ο φαινότυπος CD34⁺KDR⁺ αντιπροσωπεύει τον καλύτερο συνδυασμό όσον αφορά την ακρίβεια ανίχνευσης, τη

βιολογική σπουδαιότητα και την κλινική χρησιμότητα. Επίσης, η διαθέσιμη βιβλιογραφία προτείνει ότι ο συγκεκριμένος φαινότυπος είναι η ενδεδειγμένη λύση όταν η μέτρηση των EPCs λαμβάνεται ως βιοδείκτης του καρδιοαγγειακού κινδύνου. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποδειχθεί ξεκάθαρα αν ο φαινότυπος CD34⁺KDR⁺ πράγματι αναγνωρίζει τα λειτουργικά EPCs. Μερικοί έχουν αποδείξει ότι τα CD34⁺KDR⁺ κύτταρα συμπεριφέρονται ως EPCs in vivo [282], ενώ άλλοι προτείνουν ότι αυτά δεν διαφοροποιούνται σε πραγματικά ECs [287]. Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι ότι τα CD34⁺KDR⁺ κύτταρα είναι τόσο σπάνια στο περιφερικό αίμα υπό φυσιολογικές συνθήκες ώστε να μπορούν να απομονωθούν και να διαχωριστούν μόνο από το CB ή το κινητοποιημένο PB που είναι αρκετά διαφορετικές κυτταρικές πηγές. Ανεξάρτητα από αυτόν τον περιορισμό, θα έπρεπε να σημειωθεί ότι τα EPCs που βρίσκονται σε καλλιέργεια θεωρούνται θετικά για το CD34 και το KDR και για αυτό αυτά αντιπροσωπεύουν έναν υποπληθυσμό των κυκλοφορούντων CD34⁺KDR⁺ κυττάρων [217]. Από την άλλη πλευρά, η παθοφυσιολογική σημασία των μεταβολών στους συνολικούς πληθυσμούς των CD34⁺ κυττάρων δεν είναι ξεκάθαρη επειδή αυτοί περιέχουν περίπου 80% HSCs, 15% EPCs, μια μικρή ποσότητα πρόδρομων για άλλες γενεαλογίες και τέλος CECs [199, 288]. Επιπλέον, η σημαντική μείωση των CD34⁺ κυττάρων που είναι στην κυκλοφορία μπορεί να συσχετίζεται περισσότερο με μια γενικευμένη διαδικασία βιολογικής γήρανσης παρά ειδικά με την καρδιαγγειακή νόσο (CVD). Εντούτοις, αφού η ποσοτικοποίηση των CD34⁺ κυττάρων διεξάγεται στα περισσότερα αιματολογικά εργαστήρια, αυτή μπορεί εύκολα να εισαχθεί στην κλινική πρακτική για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου παρά οι σύνθετοι φαινότυποι των EPCs. Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι τα (E)PCs αποτελούν έναν πολύτιμο βιοδείκτη του καρδιαγγειακού κινδύνου ο οποίος συσγετίζεται με την εξέλιξη ολόκληρης της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας [199].

β) Κυτταρική καλλιέργεια

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα EPCs ταξινομούνται στα CFU-Hill ή CFU-ECs και στα CACs κύτταρα που ονομάζονται αλλιώς early EPCs, καθώς και στα OECs ή ECFCs που είναι τα late EPCs. Οι μεθοδολογίες απομόνωσης των διαφόρων τύπων EPCs απεικονίζονται στην εικόνα 2.11.



Εικόνα 2.11: Μεθοδολογίες απομόνωσης των CFU-Hill ή CFU-ECs, CACs και OECs ή ECFCs κυττάρων [259].

i) CFU-Hill

Η πρώτη μεθοδολογία, η οποία αρχικά περιγράφηκε από τον Asahara και τους συνεργάτες του [202] τροποποιήθηκε προκειμένου να απομακρυνθούν τα ώριμα ECs [289, 290]. Τα MNCs μειωμένης πυκνότητας τοποθετούνται σε επιφάνειες καλλιέργειας επικαλυμμένες με φιβρονεκτίνη και σχηματίζουν αποικίες μετά από 5-9 μέρες. Αυτές οι αποικίες αναφέρονται ως CFU-Hill, CFU-ECs ή CFUs. Τα CFU-Hill κύτταρα έχει δειχθεί ότι εκφράζουν τα επιφανειακά κυτταρικά αντιγόνα CD31, CD105, CD144, CD146, vWF και KDR, ένδειξη ότι παρουσιάζουν ενδοθηλιακό φαινότυπο. Εντούτοις, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν είναι εξειδικευμένες για αυτή την κατηγορία πρόδρομων κυττάρων. Επίσης, τα CFU-Hill παρουσιάζουν την ικανότητα να ενσωματώνουν την ακετυλιωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (ac-LDL). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό αποδίδεται κυρίως στα ECs αλλά όμως και στα μακροφάγα. Επιπλέον, τα CFU-Hill παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, εκφράζουν δείκτες μονοκυττάρων/μακροφάγων, όπως το CD14, CD45 και το CD115, φαγοκυτταρώνουν βακτήρια και εμφανίζουν δράση εστεράσης η οποία δεν είναι εξειδικευμένη [202, 258, 291-293]. Επιπρόσθετα, αυτές οι αποικίες αποτελούνται από HPCs και Τ λεμφοκύτταρα [257, 292] και έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν αιμοποιητική προέλευση [292, 294]. Μελέτες έχουν προτείνει ότι, τα CD3⁺CD31⁺CXCR4⁺ Τ κύτταρα, τα οποία αναφέρονται ως αγγειογενή Τ κύτταρα, σχηματίζουν τον πυρήνα αυτών των αποικιών [295] και ότι ένας συνδυασμός από καθαρά Τ κύτταρα και μονοκύτταρα σχηματίζουν τις δομές των CFU-Hill κυττάρων [296]. Επιπλέον, κλωνική ανάλυση έδειξε ότι τα CFU-Hill προέρχονται από το αιμοποιητικό σύστημα, έχουν μυελοειδή πρόδρομη κυτταρική δράση και διαφοροποιούνται σε φαγοκυτταρικά μακροφάγα [195, 292, 297]. Έτσι, ενώ τα CFU-Hill κύτταρα εμπλέκονται στη διέγερση και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης [203, 298, 299], οι ενδείξεις που υπάρχουν υποδηλώνουν ότι αυτά είναι αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία μπορεί ποτέ να μην μετατραπούν σε ECs στον έσω χιτώνα *in vivo* [195, 292].

ii) CACs

Μια άλλη μεθοδολογία προσδιορισμού των πιθανών πληθυσμών EPCs περιλαμβάνει την καλλιέργεια PB-MNCs σε μια επιφάνεια επικαλυμμένη με φιβρονεκτίνη κάτω από συνθήκες ενδοθηλιακής διαφοροποίησης για 4-7 μέρες χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο ανάπτυξης το οποίο είναι εξειδικευμένο για ιστούς και περιέχει διάφορους αυξητικούς παράγοντες. Στη συνέχεια, τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται και μελετώνται τα προσκολλημένα κύτταρα τα οποία παραμένουν στην επιφάνεια του πλακιδίου και έχουν αγγειογενετική ικανότητα. Για αυτό, τα CACs ονομάζονται αγγειογενετικά κύτταρα [293, 300]. Τα CACs έχει δειχθεί ότι εκφράζουν τα επιφανειακά αντιγόνα των ECs CD31, CD144, vWF και KDR, δεσμεύουν τη λεκτίνη [293, 300, 301] και προσλαμβάνουν την ac-LDL [300]. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι, τα CACs είναι εμπλουτισμένα σε μονοκύτταρα/μακροφάγα εκφράζοντας τα επιφανειακά κυτταρικά αντιγόνα CD14 και CD45 [291, 293, 302]. Όπως τα CFU-Hill κύτταρα, έτσι και τα CACs δεν παρουσιάζουν όλες τις γαρακτηριστικές ιδιότητες των EPCs [195]. Επιπλέον, σγετικά πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος απομόνωσης και καλλιέργειας είναι περίπλοκη λόγω της παρουσίας αιμοπεταλίων τα οποία απομονώνονται μαζί με τα MNCs [297]. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα MNCs που υπάρχουν στο πλακίδιο καλλιέργειας και επομένως οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων μεταφέρονται στα προσκολλημένα κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν mRNA για τις διάφορες πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στην επιφάνεια. Πολλά από αυτά τα επιφανειακά αντιγόνα τα οποία προέργονται από τα αιμοπετάλια είναι εκείνα που εκφράζονται επίσης

από τα ώριμα ECs (CD31, δέσμευση της λεκτίνης και διάφορες ιντεγκρίνες) μεταφέροντας έτσι τις αγγειογενείς τους ιδιότητες στα προσκολλημένα MNCs στην καλλιέργεια. Συνεπώς, τα συγκεκριμένα κύτταρα ίσως λανθασμένα θεωρούνται ως EPCs. Έτσι, η συγκεκριμένη μεθοδολογία απομόνωσης δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη εκτός αν αποδειχθεί ότι δεν υπάρχουν αιμοπετάλια ή πρωτεΐνες αιμοπεταλίων στην καλλιέργεια [258].

iii) OECs

Μια τρίτη μεθοδολογία καλλιέργειας είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση των OECs [303], τα οποία επίσης ονομάζονται και κύτταρα με ικανότητα να σχηματίζουν ενδοθηλιακές αποικίες (ECFCs) [217, 304] ή προχωρημένης ωρίμανσης EPCs που προέρχονται από αίμα (BOECs) [203, 205]. Τα MNCs που βρίσκονται στην κυκλοφορία και προέρχονται από το CB μπορούν να τοποθετηθούν σε επιφάνεια πλακιδίου καλλιέργειας επικαλυμμένη με κολλαγόνο τύπου Ι σχηματίζουν αποικίες με ελλειψοειδή μορφή, οι οποίες αρχίζουν να σχηματίζονται συνήθως μετά από τις 10-15 μέρες καλλιέργειας [217]. Επίσης, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ως προσκολλητικό μέσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η φιβρονεκτίνη [303, 304]. Τα OECs εκφράζουν τα αντιγόνα CD31, CD105, CD144, CD146, vWF και KDR, δεσμεύουν τη λεκτίνη και προσλαμβάνουν Ac-LDL [217, 292]. Επιπλέον, δεν εκφράζουν αντιγόνα αιμοποιητικής προέλευσης ή μονοκυττάρων/μακροφάγων, όπως το CD14, CD45 ή το CD115 [292]. Τα OECs είτε απομονωθούν από τον BM είτε από το PB ενηλίκων παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης και σχετικά υψηλά επίπεδα τελομεράσης [217].

Συμπερασματικά, στην εικόνα 2.12 απεικονίζονται μια πληθώρα από επιφανειακά κυτταρικά αντιγόνα τα οποία εκφράζονται από τα early και late EPCs. Τα κυτταρικά αντιγόνα τα οποία συσχετίζονται με τις δύο κατηγορίες των EPCs δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Εντούτοις, όπως είναι ήδη γνωστό, τόσο τα early όσο και τα late EPCs εκφράζουν KDR, CD31 και vWF, ενώ το CD133 είναι ένας δείκτης που εκφράζεται αποκλειστικά στα early EPCs υποδηλώνοντας τον πρόδρομο χαρακτήρα των συγκεκριμένων κυττάρων [305].



Εικόνα 2.12: Χαρακτηριστικοί φαινότυποι των early και late EPCs (τροποποιημένο από Traish A.M., et al.) [305].

Συνολικά, τα χαρακτηριστικά των early και late EPCs συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1). Τα αιμοποιητικής προέλευσης early EPCs μπορούν να αποκτήσουν μερικούς δείκτες ECs αλλά επίσης εκφράζουν αιμοποιητικά αντιγόνα και δεν έχουν έτσι την ικανότητα να λειτουργήσουν ως ECs (σχηματισμός αγγειακών δομών *in vitro* και *in vivo*). Τα κύτταρα που εντοπίζονται στους ιστούς, όπως τα late EPCs τα οποία προέρχονται από το αγγειακό τοίχωμα ή τον BM εμφανίζουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και εκφράζουν δείκτες και χαρακτηριστικά των ECs.
Early EPCs	Late EPCs
Σχηματισμός αποικιών με επιμήκη	Σχηματισμός μονοστοιβάδας κυττάρων
κύτταρα στην περιφέρεια (CFU-Hill)/	με ελλειψοειδή μορφή
Μονήρη κύτταρα με σφαιρικό κυρίως	
σχήμα (CACs)	
Μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού	Αυξημένη ικανότητα εξάπλωσης και
και εξάπλωσης	πολλαπλασιασμού
Έκφραση δεικτών: CD34 ⁺ , KDR ⁺ ,	Έκφραση δεικτών: CD34 ⁺ , KDR ⁺ ,
$CD133^+$, $CD31^+$, $CD14^+$, $CD45^+$,	$CD31^+$, $CD144^+$, vWF^+ , $CD105^+$,
$CD115^+$, vWF^+ , $CD144^-$	CD146 ⁺ , CD14 ⁻ , CD45 ⁻ , CD115 ⁻ ,
	CD133 ⁻
Πρόσληψη της ac-LDL και δέσμευση	Πρόσληψη της ac-LDL και δέσμευση
της λεκτίνης	της λεκτίνης
Έχουν την ικανότητα να	Δεν έχουν την ικανότητα να
φαγοκυτταρώσουν βακτήρια	φαγοκυτταρώσουν βακτήρια
Δεν εμφανίζουν την ικανότητα	Μπορούν να συνεισφέρουν στο
σχηματισμού αγγείων in vivo	σχηματισμό αγγείων in vitro και in
	vivo
Εκκρίνουν αγγειογόνους παράγοντες	Δεν εκκρίνουν αγγειογόνους
	παράγοντες

Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικοί παράμετροι των early και late EPCs

Χαρακτηριστικά της καλλιέργειας των EPCs in vitro

Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι, δεν είναι γνωστό κατά πόσο τα κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται *in vitro* υπάρχουν και στην κυκλοφορία του αίματος με τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά ή αν αυτά αντιπροσωπεύουν κυρίως έναν τεχνητό φαινότυπο ο οποίος δημιουργείται από τις συνθήκες καλλιέργειας που επικρατούν κάθε φορά. Επιπρόσθετα, λόγω της πλαστικότητας που παρουσιάζει ο κυτταρικός φαινότυπος, προκύπτει ότι η έκφραση διαφόρων εξειδικευμένων δεικτών από τα EPCs υποδηλώνει ότι ένα κύτταρο EPC σε καλλιέργεια δεν είναι απαραίτητα EPC και *in vivo* [199].

Τα περισσότερα πρωτόκολλα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για να απομονωθούν τα κυκλοφορούντα EPCs από το PB για την ταυτοποίηση στη συνέχεια των EPCs και τη χρήση τους ως βιοδείκτες στην CVD, την ανάλυση των ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μονοπατιών ή τον εμπλουτισμό των κυττάρων με σκοπό τη θεραπευτική αγγειογένεση [196, 199]. Συνολικά, τα πρωτόκολλα διαφέρουν κυρίως στη χρονική διάρκεια στην οποία καλλιεργούνται τα κύτταρα. Τα πρωτόκολλα μικρής χρονικής διάρκειας (4-7 μέρες) αποδίδουν κύτταρα με μυελοειδή/αιμοποιητικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα CACs προκύπτουν από την καλλιέργεια των PB-MNCs σε φιβρονεκτίνη για 4 μέρες σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, το οποίο περιέχει διάφορους αυξητικούς παράγοντες ανάμεσα στους οποίους είναι και ο VEGF. Επιπλέον, εκφράζουν CD45 και διάφορους μυελοειδείς δείκτες όπως το CD14 και το CD11. Παρόλο που διάφορες ερευνητικές ομάδες ανέφεραν τη συνέκφραση των ενδοθηλιακών δεικτών από τα CACs, προέκυψε το ερώτημα για το κατά πόσο η έκφραση των ενδοθηλιακών δεικτών μπορεί να προέλθει από την επιμόλυνση με τα PMPs οδηγώντας έτσι σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην κυτταρομετρία ροής [297]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταφορά επιγενετικού υλικού, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι ένας τρόπος διακυτταρικής επικοινωνίας [306-308]. Έτσι, τα επιμολυσμένα κύτταρα ή τα MPs μπορεί να μεταφέρουν RNA ή microRNAs στα καλλιεργημένα κύτταρα, οπότε τροποποιούνται τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και ο κυτταρικός φαινότυπος των πιθανών EPCs. Εντούτοις, η έλλειψη ενός σαφώς προσδιορισμένου ώριμου ενδοθηλιακού κυτταρικού φαινοτύπου στα καλλιεργημένα CACs αποδεικνύεται από το πρόσφατο εύρημα ότι οι προαγωγείς των ενδοθηλιακών γονιδίων είναι αποσιωπημένοι [277].

Συγκεκριμένα, με βάση τα πρωτεομικά δεδομένα που έχουν προκύψει από διάφορες έρευνες, προσδιορίστηκαν μεμβρανικές πρωτεΐνες λευκοκυτταρικής προέλευσης αλλά εντοπίστηκαν ακόμη αιμοπεταλιακές πρωτεΐνες υποδηλώνοντας ότι τα αιμοπετάλια δεν απομακρύνθηκαν πλήρως μέσω των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων. Στην καλλιέργεια, τα MPs που προέκυψαν από τη θραυσματοποίηση των αιμοπεταλίων, παραλήφθηκαν στη συνέχεια από τα MNCs. Καθώς εξελίχθηκε η καλλιέργεια με την πάροδο των ημερών, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και τα αιμοπετάλια εξαφανίστηκαν. Εντούτοις, χρησιμοποιώντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων ήταν ακόμη ανιγνεύσιμες. Αξιοσημείωτα, δείκτες οι οποίοι γρησιμοποιούνται στον ορισμό του φαινοτύπου των EPCs όπως το CD31 και ο vWF είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε αφθονία στα αιμοπετάλια. Το CD31 εκτός από τα αιμοπετάλια εντοπίζεται σε διαφορετικά ποσοστά σε υποκατηγορίες των λευκοκυττάρων, οπότε δεν μπορεί να ειπωθεί ότι είναι αυστηρά εξειδικευμένος δείκτης για τα ECs [309-311]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης μέσα στο ενδοκυττάριο τμήμα τους, υποδοχείς του VEGF συμπεριλαμβάνοντας και τον KDR, οι οποίοι εκτίθενται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων κατόπιν διέγερσης του VEGF [312].

Μέχρι πριν λίγα χρόνια, δεν είχε γίνει σαφές το πως τα early EPCs αποκτούν χαρακτηριστικά ECs και προάγουν την αγγειογένεση. Η πρωτεομική ανάλυση έδειξε ότι ανάμεσα στους προαγγειογόνους παράγοντες που αποκαλύφθηκαν ήταν η φωσφορυλάση

της θυμιδίνης (TP) που είναι γνωστή και ως αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF). Ο αυξητικός παράγοντας TP και το προϊόν της ενζυματικής δράσης του, η φωσφορική δεοξυριβόζη (dRP) αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητα για την επιβίωση των EPCs και ασκεί σημαντικές παρακρινικές επιδράσεις στη μετανάστευση των ECs και συμμετέχει στην αγγειογένεση [313]. Επίσης, αποδείχθηκε ότι, τα CFU-Hill εκκρίνουν υψηλά επίπεδα μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9), VEGF, ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και καθεψινών [299, 313, 314]. Η συλλογή των μη προσκολλημένων κυττάρων μετά από 48 ώρες και η τοποθέτησή τους σε άλλη επιφάνεια καλλιέργειας οδηγεί στην ελαχιστοποίηση της επιμόλυνσης με αιμοπετάλια [195, 289]. Εντούτοις, η TP εντοπίζεται στα αιμοπετάλια και στα MPs των συγκεκριμένων καλλιεργειών. Αν και οι δείκτες των αιμοπεταλίων ανιχνεύονται με τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, δεν είναι σαφές σε ποιο βαθμό άλλες πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων συμπεριλαμβανομένου και της TP, μπορούν να μεταφέρονται και/ή να επάγονται από τα PMPs [297].

Μελέτες έχουν δείξει ότι, η απελευθέρωση παραγόντων από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να αυξήσει τον αριθμό και να βελτιώσει τη λειτουργικότητα των EPCs, να επιταχύνει τη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς ECs, να καθοδηγήσει τη μετανάστευσή τους στα σημεία της αγγειακής βλάβης, να οδηγήσει στο σχηματισμό αποικιών και στην πρόσληψη της DiI-Ac-LDL από τις καλλιέργειες των EPCs [315-319]. Σε μια άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές βελτιώθηκε ο αριθμός και η λειτουργικότητα των EPCs σε ασθενείς [318]. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά χαρακτηριστικά των CACs όπως η έκφραση του CD31, vWF και η χρώση με λεκτίνη μπορεί να εξηγηθεί από την πρόσληψη των PMPs από τα MNCs [297]. Συγκεκριμένα, μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ένας μεγάλος αριθμός από PMPs συσσωρεύεται στα σημεία της ιστικής βλάβης και μπαίνουν στην κυκλοφορία του αίματος [320, 321]. Έτσι, τα MNCs προσλαμβάνουν τα PMPs οδηγώντας σε μια πιθανή ανταλλαγή των αντιγόνων ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες κυττάρων, αφού τα MPs γενικά είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως φορείς στην ανταλλαγή ενδοκυττάριων βιολογικών πληροφοριών. Έτσι, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, τα κύτταρα τα οποία είναι διπλοθετικά για τους δείκτες των αιμοποιητικών/βλαστικών κυττάρων και των ECs δεν είναι απαραίτητα EPCs [297].

Όλα αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν ότι τα σύντομης χρονικής διάρκειας καλλιέργειας των EPCs αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό ο οποίος κυρίως προέρχεται από μυελοειδή αιμοποιητικά κύτταρα και έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα ανοσολογικά

κύτταρα και ιδιαίτερα με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Για αυτό, έχει ασκηθεί κριτική στον ορισμό των CFU-Hill και CACs ως EPCs [199].

Τα OECs δεν μπορούν να αναπτυχθούν αποτελεσματικά από όλους τους δότες, επειδή οι παράγοντες ηλικία και CVD διαδραματίζουν ρόλο στη συγκεκριμένη διαδικασία [322, 323]. Εντούτοις, τα πρωτόκολλα καλλιέργειας των OECs βελτιώθηκαν και αναπτύχθηκαν μεγαλύτερες δοκιμές καλλιέργειας ακόμη και *in vivo* [324]. Τα OECs δεν συσχετίζονται κλωνικά με τα CFU-Hill και τα CACs λόγω της απουσίας αιμοποιητικών και μυελοειδών δεικτών και της ικανότητάς τους να μπορούν να σχηματίζουν αγγειακά δίκτυα. Για αυτό το λόγο, τα OECs θεωρούνται ότι είναι τα πραγματικά EPCs. Επίσης, επειδή τα OECs δεν εκφράζουν ουσιαστικά δείκτες πρόδρομων κυττάρων δεν διακρίνονται εύκολα από τα ώριμα ECs. Η ακριβής προέλευση των OECs παραμένει υπό διερεύνηση, αλλά όμως υποστηρίζεται ότι αυτά τα κύτταρα προέρχονται από το αγγειακό τοίχωμα [217]. Αν αυτή η υπόθεση είναι σωστή, τότε τα OECs δεν είναι ουσιαστικά πρόδρομα κύτταρα αλλά εξειδικευμένα ECs τα οποία έχουν υψηλή δυνατότητα πολλαπλασιασμού.

Για τον περιορισμό της πολυπλοκότητας της κυτταρικής σύνθεσης και του ορισμού των EPCs, διάφορες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν επιλεγμένα CD34⁺ ή CD133⁺ αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από το PB, CB ή το BM αντί για τα PB-MNCs. Έρευνες έδειξαν ότι δεν ήταν εφικτό να δημιουργηθούν αποικίες ώριμων ECs [276], ενώ σε άλλες μελέτες αποδείχθηκε ότι η καλλιέργεια επιλεγμένων κυττάρων οδηγεί στην έκφραση δεικτών που υπάρχουν στα ECs [280, 325, 326]. Πιθανώς, τα κύτταρα μπορεί να λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Για παράδειγμα, το άγγος ή οι φαρμακολογικοί ρυθμιστές των επιγενετικών ενζύμων προκάλεσαν μεταβολή στην επιγενετική υπογραφή των γονιδίων των ενδοθηλιακών δεικτών στα καλλιεργημένα EPCs [277]. Επίσης, πρόσφατα η ερευνητική ομάδα του Asahara αύξησε τις μεθοδολογίες οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό αποικιών και προσδιόρισε 2 διαφορετικά είδη τα οποία προκύπτουν από καλλιεργημένα CD133⁺ κύτταρα [198, 280]. Τα προσκολλημένα CD133⁺ κύτταρα σχημάτισαν CFUs που αποτελούνταν από μικρά ή μεγάλα κύτταρα. Οι μικρές αποικίες κυττάρων εμφάνισαν ένα πιο αρχέγονο αιμοποιητικό στάδιο και υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ οι μεγάλες αποικίες παρουσίασαν αγγειογενετικές ιδιότητες. Μια ιεραρχική σχέση ανάμεσα στις αρχέγονες CFUs μικρών κυττάρων και στις οριστικές CFUs μεγάλων κυττάρων

Κεφάλαιο 2

καθιερώθηκε in vitro, υποδεικνύοντας ότι ο φαινότυπος των EPCs στην καλλιέργεια εξελίσσεται με την πάροδο του χρόνου [198, 280].

Γενικά, ο ορισμός των EPCs ο οποίος βασίζεται σε πρωτόκολλα καλλιέργειας παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα που δεν έχουν διαλευκανθεί. Για παράδειγμα, από τη στιγμή που η διαδικασία της καλλιέργειας έχει ξεκινήσει, τα κύτταρα που παράγονται πιθανώς δεν αντιστοιχούν με αυτά που υπάρχουν στον οργανισμό μας. Παρόλο που τα καλλιεργημένα κύτταρα μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο, δεν είναι σαφές κατά πόσο τα κύτταρα που προέκυψαν μετά την καλλιέργεια είναι πράγματι τα ίδια κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στο ανθρώπινο σώμα. Τα καλλιεργημένα κύτταρα που παραέχουν στον κυκλοφορία. Αυτό όμως που παραμένει υπό διερεύνηση είναι ότι, τα κύτταρα που είναι στην κυκλοφορία και οδηγούν σε αυτά τα "τεχνητά" κύτταρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, κατά πόσο μπορούν να λειτουργήσουν ως EPCs *in vivo* χωρίς να χρειάζεται να καλλιεργηθούν. Ακόμη και η καλλιέργεια απλών κυττάρων με προσεκτικά επιλεγμένα κύτταρα, όπως τα CD34⁺ ή CD133⁺ δεν αποκλείει την πιθανότητα ότι αυτά τα οποίο αναπτύσσονται [199].

Χαρακτηριστικά των καλλιεργημένων EPCs in vivo

Συνολικά, τα κύτταρα τα οποία προέρχονται τόσο από τα μικρής όσο και από τα μεγάλης χρονικής διάρκειας καλλιέργειας EPCs έχουν την ικανότητα να βελτιώσουν την νεοαγγείωση σε προκλινικά πειραματόζωα [203, 292, 299, 327]. Εντούτοις, τα κύτταρα που προκύπτουν από τα διάφορα πρωτόκολλα διαφέρουν στο βαθμό της ικανότητας διαφοροποίησής τους σε ECs και σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων. Οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα CFU-Hill και τα CACs κύτταρα βελτιώνουν κυρίως το σχηματισμό των αγγείων παρέχοντας ένα ισχυρό μείγμα αυξητικών παραγόντων το οποίο συνεισφέρει στην αγγειογένεση [291, 328-330]. Αντίθετα, τα OECs κύτταρα μπορεί να διαφοροποιηθούν σε ECs και επομένως φυσιολογικά συνεισφέρουν στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων Ιο σχηματισμό νέων αλλη τυπικό χαρακτηριστικό των OECs είναι ο σχηματισμός αγγειακών δομών *in vitro*, ενώ αντίθετα τα early EPCs χρειάζεται να αλληλεπιδράσουν με ECs για να σχηματίσουν αγγειακό δίκτυο ώριμων ECs *in vitro* [302]. Παρόλα αυτά, το σύνθετο μείγμα των κυττάρων που υπάρχει στις δοκιμές καλλιέργειας των MNCs και το γεγονός ότι τα late EPCs προέρχονται από έναν σπάνιο πληθυσμό

κυττάρων ο οποίος εντοπίζεται μέσα στα early EPCs μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία κυττάρων τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστικά που είναι συνδυασμός των χαρακτηριστικών των early EPCs και των OECs. Επιπλέον, το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την κατάληξη και τη θεραπευτική τους ικανότητα, ενώ οι ειδικές συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να προωθήσουν την ενδοθηλιακή διαφοροποίηση των μυελοειδών κυττάρων [296, 331]. Επίσης, το περιβάλλον *in vivo* μπορεί να επηρεάσει την κατάληξη και τη λειτουργικότητα των κυττάρων. Επιπρόσθετη πολυπλοκότητα μπορεί να υπάρχει εξαιτίας του γεγονότος ότι τα κύτταρα τα οποία προέρχονται από τον BM ή την κυκλοφορία του αίματος μπορούν να ενσωματωθούν στην περιοχή γύρω από το αγγείο, οπότε έμμεσα προάγεται η ανάπτυξη των αγγείων και ενδεχομένως η σταθερότητά τους χωρίς όμως το σχηματισμό νέου ενδοθηλίου. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό έχει αποδειχθεί ότι ισχύει για τα αιμοποιητικά κύτταρα [332].

Σύγκριση ΟΕCs από PB και CB

Είναι γνωστό ότι, το CB ανθρώπου, το οποίο μπορεί να αποκτηθεί εύκολα από τις τράπεζες CB, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον από τους ερευνητές ως μια πολύ καλή και πλούσια πηγή σε EPCs, επειδή έχει βρεθεί ότι περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ενεργών βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων συγκριτικά με το PB ενηλίκων [333-336].

Σε μια μελέτη που έγινε, σχηματίστηκαν EPCs και συγκεκριμένα OECs από την απομόνωση των MNCs του PB και του CB. Στη συγκεκριμένη έρευνα, η φαινοτυπική ανάλυση των OECs που προήλθαν είτε από το PB είτε από το CB, έδειξε ότι το αρχικό μέγεθος των αποικών ήταν παρόμοιο και στους δύο κυτταρικούς τύπους, ενώ η συχνότητα σχηματισμού και ο χρόνος εμφάνισης των αποικιών διέφεραν ανάμεσα στις δύο κατηγορίες κυττάρων [333]. Όταν τα κύτταρα είχαν καλύψει πλήρως την επιφάνεια του πλακιδίου (confluent), τότε και οι δύο κατηγορίες των OECs είχαν μία τυπική ενδοθηλιακή ελλειψοειδή μορφολογία, θετική έκφραση για δείκτες ECs (KDR, CD31, VEκαδερίνη), ενώ δεν παρουσίασαν έκφραση για αιμοποιητικούς δείκτες (CD14, CD45). Πάντως, ήταν δύσκολο να ξεχωρίσουν οι ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα PB-OECs και στα CB-OECs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ανάλυσης. Σε άλλες έρευνες που έχουν γίνει, αποδείχθηκε ότι τα EPCs τα οποία προέρχονται από το PB και το CB εμφάνισαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόμοια, όπως η μορφολογία και η έκφραση των

Κεφάλαιο 2

επιφανειακών δεικτών. Εντούτοις, η χρονική διάρκεια και η λειτουργικότητα των αγγείων που προέρχονται από τα OECs είναι διαφορετικά in vivo και εξαρτώνται από την κυτταρική πηγή. Προέκυψε ότι, τα CB-OECs σχημάτισαν αιμοφόρα αγγεία με φυσιολογική λειτουργία τα οποία διήρκησαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τα PB-OECs. Τα CB-EPCs σχημάτισαν ένα δίκτυο από μικροαγγεία το οποίο παρέμεινε σταθερό για περισσότερο από 119 μέρες. Αντίθετα, τα αιμοφόρα αγγεία τα οποία προέρχονται από τα PB-EPCs άρχισαν να υποχωρούν και να εξαφανίζονται πλήρως σχεδόν 1 μήνα μετά τη μεταμόσχευση. Συνοπτικά, τα CB-EPCs διαθέτουν μεγαλύτερη αγγειογενετική ικανότητα *in vivo* σε σύγκριση με τα PB-EPCs στους ενήλικες [333, 337-339]. Είναι σαφές επομένως ότι, η θεραπευτική ικανότητα των EPCs είναι διαφορετική εξαρτώμενη κάθε φορά από την κυτταρική πηγή. Εντούτοις, δεν έχει ερευνηθεί ακόμη η προέλευση των σημαντικών παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την *in vivo* θεραπευτική τους ικανότητα [333].

EPCs και Αθηροσκλήρωση

Οι περισσότερες αρτηριακές νόσοι περιλαμβάνουν τη βλάβη ή και την απόπτωση των ECs [201, 340]. Η αθηροσκλήρωση είναι η πιο διαδεδομένη συστηματική φλεγμονώδης νόσος του αρτηριακού τοιχώματος παγκοσμίως [201, 341, 342]. Επίσης, είναι μια χρόνια νόσος η οποία δεν εμφανίζει συμπτώματα [343]. Το 75% περίπου όλων των θανάτων που προέρχονται από καρδιαγγειακά νοσήματα οφείλονται σε καρδιακή προσβολή ή εγκεφαλικό, τα οποία προκαλούνται από την αθηροσκλήρωση, η οποία παραμένει η κυρίαρχη αιτία θνησιμότητας στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής [215, 344]. Στην αθηροσκλήρωση παρατηρείται ο σχηματισμός αθηρωματικών πλακών σε μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηρίες [215, 345]. Οι πλάκες μπορούν να μειώσουν σημαντικά την παροχή αίματος σε ένα όργανο, οδηγώντας σε συμπτώματα όπως στηθάγχη, διαλείπουσα χωλότητα και νεφραγγειακή υπέρταση. Επιπλέον, οι έντονες θρομβωτικές ή αιμορραγικές επιπλοκές που προκαλεί η πλάκα μπορούν να οδηγήσουν σε αρτηριακή έμφραξη, καταλήγοντας τελικά σε μυοκαρδιακή νέκρωση ή εγκεφαλικό. Έτσι προκύπτει ότι, η αθηροσκλήρωση κατέχει σημαντική θέση στη δημόσια υγεία, καθώς αυτή συσχετίζεται με εκτεταμένη νοσηρότητα και θνησιμότητα.

Μια βλάβη στην εσωτερική στοιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος, το ενδοθήλιο, αποτελεί την έναρξη της διαδικασίας η οποία οδηγεί στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας [342]. Η αθηροσκλήρωση προέρχεται από βλάβη στα ECs, συχνά ως αποτέλεσμα της φλεγμονής ή φυσιολογικής διαταραχής στην επιφάνεια των αγγείων, η οποία οδηγεί στην απώλεια της ακεραιότητας της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας. Αυτή η βλάβη ακολουθείται από τη διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων τα οποία προάγουν την απόπτωση και τη δυσλειτουργία των ECs, όπως επίσης και από την εναπόθεση λιπιδίων και τον πολλαπλασιασμό των SMCs που οδηγούν στο σχηματισμό μιας νέας έσω στοιβάδας [346, 347]. Έτσι, καταλήγουμε στη δημιουργία πλακών στο αρτηριακό τοίχωμα, οι οποίες περιέχουν κυρίως χοληστερόλη και φλεγμονώδη κύτταρα [215, 348, 349]. Οι αθηροσκληρωτικές πλάκες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τις σταθερές και τις ασταθείς [345, 350]. Η παθοφυσιολογία των αθηροσκληρωτικών πλακών είναι πολύ σύνθετη, αλλά γενικά οι σταθερές πλάκες, οι οποίες έχουν την τάση να είναι ασυμπτωματικές είναι πλούσιες σε ECM και SMCs, ενώ οι ασταθείς αποτελούνται κυρίως από μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα [351]. Επιπλέον, η ΕCM διαγωρίζει την πλάκα από τον αρτηριακό αυλό, γνωστός και ως ινώδης κάψα. Στις ασταθείς πλάκες, οι ρήξεις της ινώδους κάψας εκθέτουν το θρομβογενές υλικό όπως το κολλαγόνο στην κυκλοφορία και τελικά οδηγούμαστε στο σχηματισμό θρόμβου στον αυλό [352], όπως απεικονίζεται στην εικόνα 2.13. Στην παρακάτω εικόνα διαφαίνονται συνολικά τα χαρακτηριστικά στάδια της αθηροσκλήρωσης. Παρατηρείται προοδευτική μείωση των επιπέδων των EPCs παράλληλα με την εξέλιξη της νόσου. Όταν σχηματιστεί θρόμβος, τότε πυροδοτείται η διαδικασία της κινητοποίησης των EPCs, που συνδέεται με την αύξηση των επιπέδων τους, με σκοπό την αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη.

Συνεπώς, η ανάπλαση του ενδοθηλίου είναι μια προφανής λύση για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης. Αξιοσημείωτα, το ενδοθήλιο έχει την ικανότητα να επιδιορθώνεται από μόνο του [353]. Όταν μια μικρή περιοχή της έσω στοιβάδας της αρτηρίας μετακινείται, τα ECs στα άκρα της αθηρωματικής πλάκας πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν κοντά στο κέντρο της. Εάν το ενδοθήλιο είναι νέο και υγιές, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η διαδικασία της τοπικής επιδιόρθωσης είναι πλήρης και γίνεται ανασύσταση της έσω στοιβάδας της αρτηρίας. Αντίθετα, αν το ενδοθήλιο είναι μεγάλο σε ηλικία ή υπόκειται στην επίδραση ενός ή περισσότερων παραγόντων κινδύνου, όπως η χοληστερόλη, η υπέρταση, το κάπνισμα, η παχυσαρκία ή η υπεργλυκαιμία, τότε η τοπική επιδιόρθωση είναι είναι ελαττωματική και μια αθηρωματική

Κεφάλαιο 2

πλάκα μπορεί να αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα μιας φλεγμονώδους διαδικασίας που προκαλείται κυρίως από τη συσσώρευση μακροφάγων [354]. Μελέτες έχουν δείξει ότι, στην περίπτωση αυξημένης βλάβης στο ενδοθήλιο, η ενδοθηλιακή αποκατάσταση δεν γίνεται από τα τοπικά κύτταρα, αλλά και με τη συνεισφορά των κυττάρων που είναι στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα που έγουν την ικανότητα να επιδιορθώνουν το ενδοθήλιο και να παρεμποδίζουν την αθηροσκλήρωση είναι τα EPCs [201, 202, 215, 355]. Τα EPCs στην περιφερική κυκλοφορία μπορούν να κινητοποιηθούν από διάφορους παράγοντες [215, 356, 357]. Στο PB, τα EPCs μπορούν να επιδιορθώσουν αποτελεσματικά την ενδοθηλιακή στοιβάδα αποκαθιστώντας την ακεραιότητα του ενδοθηλίου στις θέσεις της βλάβης της έσω στοιβάδας της αρτηρίας [358, 359]. Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα EPCs και τα ώριμα ECs διαμέσου της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και της έκκρισης των χημειοκινών [342, 360-362]. Παρόλο που τα EPCs μπορεί να είναι σημαντικά για την αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη στην επιφάνεια των αγγείων, η επακόλουθη διατήρηση και ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας περιλαμβάνει το σχηματισμό αγγείων στην έσω στοιβάδα του ιστού, μια διαδικασία η οποία πιθανώς βελτιώνεται από την παρουσία των EPCs. Η αγγειακή πυκνότητα έχει επίσης αποδειχτεί ότι είναι μεγαλύτερη στις αθηρωματικές πλάκες, οι οποίες εμφανίζουν ενδείξεις αιμορραγίας, ρήξη πλάκας και φλεγμονή, υποδηλώνοντας ότι ο σχηματισμός νέων αγγείων συνδέεται με την ευπάθεια της πλάκας [363]. Η πραγματική ποσοτική συνεισφορά των EPCs στην ενδοθηλιακή ομοιόσταση δεν είναι γνωστή επακριβώς, αλλά έρευνες έδειξαν ότι τα EPCs είναι απαραίτητα για την ενδοθηλιακή επιδιόρθωση και ότι η σημαντική μείωση των EPCs παρεμποδίζει την πλήρη αναγέννηση [364-366]. Ένας αριθμός ερευνών απέδειξε ότι η μεταμόσγευση των EPCs ή κινητοποίηση των ενδογενών EPCs χρησιμοποιώντας παράγοντες όπως οι στατίνες και ο G-SCF, συνεισφέρουν στην επανενδοθηλιοποίηση των απογυμνωμένων αγγείων in vivo, μειώνοντας το σχηματισμό νέας έσω στοιβάδας [358, 359, 367, 368].



Εικόνα 2.13: Απεικόνιση των χαρακτηριστικών σταδίων της αθηροσκλήρωσης και συσχετισμός αυτών με τα επίπεδα των EPCs. ATS: αθηροσκλήρωση, IMT: πάχος μεσαίου στρώματος του εσωτερικού τμήματος οργάνου [342].

Ο ρόλος των EPCs στην αναγέννηση του ενδοθηλίου

Ορισμός επαναγγείωσης

Η ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων διαδραματίζει ένα αρκετά σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες [369]. Η επαναγγείωση είναι η διαδικασία αποκατάστασης ή αναγέννησης των αιμοφόρων αγγείων τα οποία έχουν υποστεί βλάβη. Είναι απαραίτητη για την επιβίωση των αναπτυσσόμενων, κατεστραμμένων και ισχαιμικών ιστών κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής [213]. Η επαναγγείωση μπορεί να συμβεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

(1) Το πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης (vasculogenesis) (εικόνα 2.14) που είναι ένας μηχανισμός δύο βημάτων:

1. Προσδιορισμός και διαφοροποίηση των EPCs από το μεσόδερμα

2. Οργάνωση de novo των EPCs σε ένα δίκτυο αιμοφόρων αγγείων [369]

Τα αγγεία σχηματίζονται μέσω συνδυασμού των αγγειοβλαστών ή των EPCs, μια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [213],

Κεφάλαιο 2

(2) την αγγειογένεση (angiogenesis) (εικόνα 2.15), που είναι η περαιτέρω εξάπλωση και δικτύωση των αρχικών αγγείων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων τριχοειδών από ώριμα ECs των αιμοφόρων αγγείων που ήδη υπάρχουν [369-371]

(3) και την αρτηριογένεση, δηλαδή την ανάπτυξη βοηθητικών αγγείων αυξάνοντας το μέγεθος και την ικανότητα των βοηθητικών συνδέσεων των αρτηριδίων που ήδη υπάρχουν (εικόνα 2.16) [372]. Αρχικά, το πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης θεωρήθηκε ότι είναι περιορισμένο μόνο στην εμβρυονική ανάπτυξη, ενώ η αγγειογένεση και η αρτηριογένεση ότι είναι υπεύθυνες για την επαναγγείωση στους ενήλικες. Εντούτοις, προέκυψαν διάφορα στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν ότι τα EPCs που είναι στην κυκλοφορία και προέρχονται από το BM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαναγγείωση κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες στους ενήλικες μέσω του πρώιμου σταδίου της αγγειογένεσης [373, 374]. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη γενική ιδέα του μεταγεννητικού πρώιμου σταδίου της αγγειογένεσης (δηλαδή ο de novo σχηματισμός αγγείων από ΕPCs) [207, 281, 356, 373, 375]. Συνοπτικά, οι δύο έννοιες είναι διαφορετικές. Πρώτον, ο όρος αγγειογένεση δηλώνει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από αγγεία που ήδη υπάρχουν, ενώ δεύτερον, το πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης είναι η έννοια που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων χωρίς να προϋπάρχουν αγγεία, μέσω μιας de novo παραγωγής των ΕCs.

Όσον αφορά την αγγειογένεση, αυτή μπορεί να διακριθεί στην "αναπτυγμένη αγγειογένεση" (sprouting angiogenesis) και στη "μη αναπτυγμένη αγγειογένεση" (intussusception) [293]. Η αναπτυγμένη αγγειογένεση ήταν η πρώτη μορφή αγγειογένεσης που ταυτοποιήθηκε. Αποδείχθηκε ότι αυτός ο τύπος αγγειογένεσης μπορεί να διαχωριστεί σε διάφορα βήματα διαδοχικής μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, τρισδιάστατης οργάνωσης και σχηματισμού σωλήνων των ECs [376-379]. Η "αναπτυγμένη αγγειογένεση" είναι αισθητά διαφορετική από τη "μη αναπτυγμένη αγγειογένεση", επειδή αυτή σχηματίζει αποκλειστικά νέα αγγεία ενώ η δεύτερη αγγεία που ήδη υπάρχουν. Ο εγκολεασμός (intussusception) είναι η διαίρεση των αγγείων και ο σχηματισμός σωματικών οργάνων μέσω διάμεσου ιστού [371, 380, 381].



Εικόνα 2.14: Το πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης (vasculogenesis) ορίζεται ως ο προσδιορισμός και η διαφοροποίηση των EPCs από τις μεσοδερμικές νησίδες αίματος και την de novo οργάνωσή τους σε ένα αγγειακό δίκτυο. Α) νησίδες αίματος (αιμαγγειοβλάστες), B) αιμοβλάστες, C) αγγειοβλάστες, D) ερυθροκύτταρα σε αγγείο [369].



Εικόνα 2.15: 'Αναπτυγμένη αγγειογένεση' (angiogenesis): αύξηση των ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων μέσω μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, τρισδιάστατης οργάνωσης και σχηματισμού σωλήνων των ECs. 'Μη αναπτυγμένη αγγειογένεση' (εγκολεασμός): διαίρεση των αγγείων και σχηματισμός σωματικών οργάνων μέσω του διάμεσου ιστού (Τροποποιημένο από Kabmeyer S., et al.) [369].



Εικόνα 2.16: Μηχανισμοί νέο-/επανα-αγγείωσης: αγγειογένεση, πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης και αρτηριογένεση (Τροποποιημένο από Freedman S.B., et al.) [372].

Συνεισφορά των early και late EPCs στην αγγειακή επιδιόρθωση και νεοαγγειογένεση

Τα early EPCs θεωρούνταν ότι είναι τύπος βλαστικού κυττάρου ο οποίος διαφοροποιείται σε ECs και ενσωματώνεται στην επένδυση των αιμοφόρων αγγείων. Βασισμένοι όμως σε πρωτεομική ανάλυση των καλλιεργειών των EPCs και διάφορων άλλων ευρημάτων, προτείνεται ένα δοκιμαστικό μοντέλο όπου η αγγειακή επιδιόρθωση μπορεί να αρχίσει από τα PMPs (Εικόνα 2.17). Τα PMPs στρατολογούν τα μονοκύτταρα σε περιοχές που έχουν υποστεί αγγειακή βλάβη. Μια μεσολαβούμενη από τα PMPs πρωτεΐνη και η ανταλλαγή mRNA μπορεί να μεταβάλλουν τη λειτουργία των μονοκυττάρων και/ή να προάγουν τη μετάβαση σε ένα φαινότυπο προαγγειογόνων μακροφάγων. Τα PMPs και τα αγγειογενή μακροφάγα μπορούν να επιταχύνουν τη στρατολόγηση των γειτονικών ECs. Για παράδειγμα, η TP, ένα ένζυμο ταυτοποιήθηκε ότι είναι ανάμεσα στους προαγγειογόνους παράγοντες στις καλλιέργειες των EPCs. Η TP παράγει έναν αγγειογενή μεταβολίτη, το 2-δέοξυ-D-ριβόζη-φωσφορικό. Η έκφραση του TP από τα EPCs μπορεί να συνεισφέρει στη μετανάστευση των ECs κοντά στο σημείο της βλάβης και στην επούλωση του τραύματος. Αυτό το πρόσφατο εύρημα δείχνει ότι τα early EPCs, δηλαδή τα CFU-Hill και τα CACs δεν είναι πραγματικά EPCs και δεν ενσωματώνονται στο αγγειακό δίκτυο [309].

Τα early και τα late EPCs απελευθερώνονται από το BM ή άλλους ιστούς και συμμετέχουν στην αγγειακή επιδιόρθωση και τη νεοαγγειογένεση. Τα αιμοποιητικά early EPCs που είναι στην κυκλοφορία εμφανίζουν μια παρακρινική ικανότητα συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην επανενδοθηλιοποίηση και στο σχηματισμό νέων αγγείων που πραγματοποιείται άμεσα από τα late EPCs τα οποία εντοπίζονται στην κυκλοφορία και στο αγγειακό τοίχωμα (Εικόνα 2.18) [382].



Εικόνα 2.17: Αναθεωρημένο μοντέλο όπου φαίνεται η συνεισφορά των early EPCs στην αγγειογένεση [309].



Εικόνα 2.18: Σχηματική απεικόνιση της συνεισφοράς των early και late EPCs στην αγγειακή επιδιόρθωση και στο σχηματισμό νέων αγγείων [382].

Απόπτωση και αναγέννηση των ECs

Είναι γνωστό ότι, η ικανότητα αναγέννησης του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική παρεμπόδιση της αθηροσκλήρωσης. Εντούτοις, η κατάσταση στο αγγειακό τοίχωμα είναι περίπλοκη. Η ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και στην αναγέννηση των ECs μπορεί ουσιαστικά να προσδιορίσει την έκταση και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Εικόνα 2.19). Σε μια έρευνα αποδείχθηκε ότι τα αποπτωτικά MPs επηρεάζουν τη μετανάστευση των EPCs *in vitro*, υποδεικνύοντας μια στενή αλληλεπίδραση ανάμεσα στην απόπτωση των EPCs και των ECs στο αγγειακό τοίχωμα [383]. Ο καθορισμός ενός δείκτη αγγειακής επιδιόρθωσης, που αποτελείται από επιμέρους δείκτες για τον προσδιορισμό της αναγέννησης και της απόπτωσης των ECs μπορεί να είναι χρήσιμος για την προσομοίωση της κατάστασης στην ενδοθηλιακή μονοστοιβάδα. Επιπλέον, ένας δείκτης αγγειακής επιδιόρθωσης μπορεί να είναι ωφέλιμος ως ένα σημαντικό εργαλείο πρόβλεψης του καρδιαγγειακού κινδύνου και μπορεί να είναι πιθανώς βοηθητικός κατά την παρακολούθηση της θεραπείας.



Εικόνα 2.19: Η ισορροπία ανάμεσα στην ενδοθηλιακή κυτταρική απόπτωση και στην ενδοθηλιακή κυτταρική αναγέννηση μπορεί να καθορίσει την έκταση και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [384].

Στην εικόνα 2.19 απεικονίζεται μακροσκοπικά η ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και την ανάπλαση των ECs. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται από τη μικροσκοπική του πλευρά στην εικόνα 2.20. Μια μελέτη αποδεικνύει ξεκάθαρα ότι σε ένα ευκρινές σημείο κατά τη διάρκεια της αθηροσκληρωτικής ανάπτυξης, (τουλάχιστον στο γονιδιωματικό επίπεδο) η φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στη βλάβη και στην ανάπλαση των ECs, η οποία θεωρείται ότι υφίσταται στα υγιή άτομα χωρίς αθηροσκληρωτική νόσο, αποσταθεροποιείται [385]. Στη συνέχεια, οι διαδικασίες που οδηγούν στην απόπτωση υπερτερούν ως προς αυτές που καταλήγουν στην αναγέννηση οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην έναρξη και εξέλιξη μιας αθηρωματικής πλάκας. Η βλάβη των ECs μπορεί να μετρηθεί in vivo αξιοποιώντας τα ενδοθηλιακά μικροσωματίδια (EMPs) που είναι στην κυκλοφορία [165, 386]. Αυτά τα μεμβρανικά σωματίδια αποβάλλονται από τα ενεργοποιημένα και αποπτωτικά ECs και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Τα EMPs αυξάνονται σε όλες τις συνθήκες της συστηματικής βλάβης των ECs π.χ. αρτηριακή υπέρταση, διαβήτης, υπερλιπιδαιμία όπως επίσης και στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα [387-390]. Επιπρόσθετα, τα EMPs αποδείχθηκαν ότι συσχετίζονται με την ενδοθηλιακή λειτουργία in vitro [165]. Τα EPCs

EPCs

και τα EMPs μπορεί να αξιοποιηθούν ως πιθανοί δείκτες διαβάθμισης του κινδύνου σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση [391].



Εικόνα 2.20: Ενδοθηλιακή κυτταρική απόπτωση και ενδοθηλιακή κυτταρική αναγέννηση (τροποποιημένο από Werner N., et al.) [392].

Η ανάπλαση των αποπτωτικών ECs γίνεται είτε μέσω των γειτονικών ECs είτε μέσω των EPCs που είναι στο PB και προέρχονται από τον BM. Το στάδιο της αναγέννησης απεικονίζεται αναλυτικότερα στην εικόνα 2.21. Όταν υπάρχουν φυσιολογικές συνθήκες, η ακεραιότητα του ενδοθηλίου εξασφαλίζεται εξαιτίας της αποτελεσματικής ενδοθηλιακής κυτταρικής επιδιόρθωσης. Εντούτοις, το σύστημα χάνει την ισορροπία του σε συνθήκες αυξημένης ενδοθηλιακής κυτταρικής απόπτωσης και ελαττωμένης επιδιόρθωσης των ECs που μεσολαβείται όμως από τα πρόδρομα κύτταρα. Η ρήξη του ενδοθηλίου, η οποία δεν μπορεί να ανασυσταθεί αποτελεσματικά, οδηγεί στην ανάπτυξη και εξέλιξη μιας αθηρωματικής πλάκας.

Στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης, όπως στο στάδιο της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, οι τροποποιήσεις στους πολυποίκιλους παράγοντες κινδύνου είναι προφανώς η κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση. Σε προχωρημένα στάδια της αθηρωμάτωσης, κυρίως στο σημείο όπου η αναγέννηση εξασθενεί, η βελτίωση της

ικανότητας αναγέννησης του οργανισμού μπορεί να διαδραματίσει επίσης σημαντικό ρόλο. Η ενδυνάμωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί μέσω των παραγόντων κινητοποίησης των EPCs (εικόνα 2.21).



Εικόνα 2.21: Συνεισφορά των EPCs στην ανανέωση/αναζωογόνηση της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας κατόπιν βλάβης των ECs. Η αποτελεσματική αναγέννηση της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας μπορεί να είναι βασική προϋπόθεση για την παρεμπόδιση σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας (τροποποιημένο από Werner N., et al.) [391].

Όπως φαίνεται και από το σχήμα, οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου επηρεάζουν αρνητικά τον αριθμό και τη λειτουργικότητα των EPCs, ενώ η πλειονότητα των καρδιοπροστατευτικών παραγόντων συμβάλλει θετικά στα EPCs μέσω της δράσης τους. Η ''πηγή'' των EPCs αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν αρμονικά στη διαδικασία της ενδοθηλιακής επούλωσης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα EPCs που προέρχονται από τον BM συνεισφέρουν με ικανοποιητικό αριθμό στην αναγέννηση του αγγειακού τοιχώματος και οι οποίες προέρχονται από ένα υπολογιστικό μοντέλο [185, 393].

Η εγκατάσταση/στρατολόγηση είναι η διαδικασία κινητοποίησης των EPCs στο σημείο της βλάβης ή της ισχαιμίας. Μια επιπρόσθετη στρατηγική για να αυξηθεί η συνεισφορά των EPCs στο πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης σε ισχαιμικές παθήσεις

μπορεί ενδεχομένως να επιτευχθεί διαμέσου της αυξημένης εγκατάστασης στο σημείο της βλάβης. O SDF-1, μια χημειοκίνη της οικογένειας των CXC, η οποία δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα CXCR4, έχει αποδειχθεί ότι έχει μια χημειοτακτική επίδραση στα EPCs *in vitro* και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση των EPCs [394]. Επιπλέον, το VLA-4 και η IL-8 αποδείχθηκαν ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση των EPCs [395, 396]. Τέλος, ουσιώδη ρόλο στη διαδικασία της κινητοποίησης των EPCs διαδραματίζουν και διάφοροι ορμονικοί παράγοντες, όπως τα οιστρογόνα και η ερυθροποιητίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με τα ECs και EPCs

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση

Τα αιμοπετάλια δεν αποτελούν μόνο μία αποθήκη φυσιολογικών ενεργών ουσιών, αλλά κατόπιν ενεργοποίησής τους, παράγουν και φλεγμονώδεις παράγοντες από ενδογενή πρόδρομα. Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων αποτελούν τις κύριες αποθήκες φλεγμονωδών διαμεσολαβητών: κατιονικών πρωτεϊνών, χημειοκινών της C-X-C και της C-C οικογένειας, ιντερλευκινών και προσκολλητικών πρωτεϊνών. Οι κατιονικές πρωτεΐνες των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και την αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων [397]. Η χημειοκίνη επιθηλιακή ουδετερόφιληενεργοποιητική πρωτεΐνη-78 (ENA-78, epithelial neutrophil-activating protein-78) επάγει την έξω προς τα μέσα σηματοδότηση των β2 ιντεγκρινών, αυξάνοντας την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια. Η ρυθμιζόμενη μετά από ενεργοποίηση κανονικών Τ κυττάρων που εκφράζεται και εκκρίνεται (RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) αποτελεί γέφυρα μεταξύ του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου και των MNCs. Επίσης προκαλεί ραγδαία ενδοκυττάρια σηματοδότηση στα λευκοκύτταρα και τα μονοκύτταρα επιδρώντας στη γονιδιακή έκφραση που ελέγχει τη φλεγμονή [398]. Η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (MCP-1) συμβάλλει στο γημειοτακτισμό μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων και στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Η φλεγμονώδης πρωτεΐνη-1a των μακροφάγων (MIP-1) είναι πιθανός διαμεσολαβητής της φλεγμονής μέσω ιού in vivo. Ο αιμοπεταλιακός παράγοντας-4 (PF-4) είναι χημειοτακτικός για τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τους ινοβλάστες και μπορεί να διεγείρει τα βασεόφιλα ώστε να απελευθερώσουν ισταμίνη. Κατόπιν ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην κυτταρική μεμβράνη το προσκολλητικό μόριο Ρ-σελεκτίνη, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων-ενδοθηλίου και αιμοπεταλίωνλευκοκυττάρων και στην εναπόθεση RANTES στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Επίσης η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) που απελευθερώνονται από αιμοπετάλια

κατόπιν ενεργοποίησής τους με θρομβίνη, προάγουν τον χημειοτακτισμό και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων διευκολύνοντας την αποδόμηση του υπενδοθηλιακού χώρου [399, 400].

Ο PDGF που απελευθερώνεται από τα α-κοκκία είναι σημαντικός όχι μόνο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, αλλά επίσης επάγει τον χημειοτακτισμό και την ενεργοποίηση τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των μονοκυττάρων [401]. Επιπλέον, παράλληλα με τον PDGF, ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) που εκκρίνονται, διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των SMCs και των ινοβλαστών του αρτηριακού τοιχώματος, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας ή στη δημιουργία της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική [48].

Όσον αφορά τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, αυτά περιέχουν σεροτονίνη, ισταμίνη και τα νουκλεοτίδια ADP και ATP. Η σεροτονίνη συμπεριφέρεται ως φλεγμονώδης παράγοντας αυξάνοντας τη διαπερατότητα του αρτηριακού τοιχώματος και οδηγώντας στην παραγωγή υπεροξειδίων από τα μακροφάγα. Τόσο το ADP όσο και το ATP αυξάνουν τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα ουδετερόφιλα και προκαλούν αύξηση της οξείδωσης, ενώ το ADP επάγει την ανάδρομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Επιπρόσθετα, το DTS είναι το κύριο οργανίδιο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του AA, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή TxA₂, λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και PAF, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μια μεγάλη ποικιλία από φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Τα αιμοπετάλια σε αυτό το οργανίδιο συνθέτουν μια πληθώρα από κυκλικά ενδοϋπεροξείδια και την προσταγλανδίνη της σειράς Ε τα οποία συμμετέχουν στην επαγωγή του οιδήματος και του πόνου.

Επίσης τα αιμοπετάλια παράγουν προφλεγμονώδη ένζυμα ή λιπίδια όπως την COX-1, την COX-2 ή τα εικοσανοειδή και τον PAF. Ο PAF επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των μακροφάγων και προκαλεί αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Επίσης η IL-1β που παράγεται αυξάνει την ικανότητα προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στα ECs. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια παράγουν θρομβίνη, έναν ισχυρό αγωνιστή που επάγει την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης για τη δέσμευση με τα λευκοκύτταρα [48, 397].

Εν κατακλείδι, θα προσθέταμε ότι ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη φλεγμονή οφείλεται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό και στα PMPs. Τα PMPs φέρουν αρκετούς προφλεγμονώδεις παράγοντες στην κυτταρική τους μεμβράνη και διαδραματίζουν πολυποίκιλο και ουσιαστικό ρόλο στη φλεγμονή [165, 320]. Επίσης, η έκφραση του CD40L στην κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων είναι προφλεγμονώδης, ενεργοποιώντας το ενδοθήλιο, τα SMCs και τα μονοκύτταρα και επάγοντας την έκφραση χημειοκινών, μορίων προσκόλλησης και του TF [60]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια εκφράζουν τους τύπου Toll υποδοχείς (TLR) που ειδικεύονται στην αναγνώριση μορίων των παθογόνων μικροοργανισμών, συγκεκριμένα τον TLR-2 και τον TLR-4, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση, προάγοντας το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και ενεργοποιώντας τα μονοκύτταρα και τα ECs [402, 403]. Οι TLR-2 και TLR-4 στα αιμοπετάλια διεγείρουν την απελευθέρωση του PAF και των δραστικών μορφών οξυγόνου, αυξάνοντας την επαγόμενη από τους αγωνιστές συσσώρευση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μορφών μικροτειδαίουν των παθογόνων μικροτας το το του την απολειθέρωση του PAF και των δραστικών μορφών οξυγόνου, αυξάνοντας την επαγόμενη από τους αγωνιστές συσσώρευση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα [404].

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων είναι αναμενόμενη, όχι μόνο γιατί η απομόνωση των λευκοκυττάρων συχνά συνοδεύεται από επιμόλυνση αιμοπεταλίων, αλλά και γιατί τα δύο αυτά είδη κυττάρων μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, έχουν ενεργό λιπιδιακό μεταβολισμό, επιδεικνύουν μερικές ομολογίες μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων τους και εκφράζουν αρκετά κοινά προσκολλητικά μόρια μετά από την ενεργοποίησή τους [401].

Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια σε περίπτωση βλάβης ή καταστροφής του ενδοθηλίου, μπορούν να προσκολληθούν στον υπενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος. Εκτός από αυτού του είδους την προσκόλληση, τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν και στο ακέραιο μη κατεστραμμένο ενδοθήλιο, όταν αυτό έχει απλώς ενεργοποιηθεί [48]. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ECs μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε διαμέσου των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ECs ενεργοποιεί το ενδοθήλιο με αποτέλεσμα την έκφραση της Ρ-σελεκτίνης από τα ενδοκυττάρια κοκκία τους στην επιφάνεια της κυτταρικής τους

μεμβράνης, γνωστά και ως σωματίδια Weibel-Palade, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από διάφορους αγωνιστές, όπως η θρομβίνη, η ισταμίνη και οι ελεύθερες ρίζες O₂ [405]. Η απευθείας σύνδεση των αιμοπεταλίων στα ECs γίνεται με τη βοήθεια της P-σελεκτίνης και του vWF. Αρχικά τα αιμοπετάλια διαμέσου της GPIba και του γλυκοπρωτεϊνικού προσδέτη της P-σελεκτίνης (PSGL-1) αλληλεπιδρούν με την ενδοθηλιακή P-σελεκτίνη με αποτέλεσμα την κύλιση και τη χαλαρή προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα ECs. Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο σταθεροποιείται τελικά διαμέσου των $β_3$ ιντεγκρινών, του ενεργοποιημένου αιμοπεταλιακού υποδοχέα $α_{IIb}β_3$ και του υποδοχέα των ECs $α_Vβ_3$ (Εικόνα 3.1) [406, 407].



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο (Τροποποιημένο από Gawaz M., et al.) [408].

Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων διαμέσου του ενεργοποιημένου α_{IIb}β₃ οδηγεί στην έκφραση της P-σελεκτίνης αλλά και στην απελευθέρωση του CD40L και της IL-1β. Η IL-1β ενεργοποιεί τα ECs και επάγει την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών μορίων όπως του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης-1 (ICAM-1), του προσκολλητικού μορίου του αγγειακού τοιχώματος-1 (VCAM-1) και της MCP-1. Επιπρόσθετα η IL-1β επάγει την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα-κB (NF-kB, nuclear factor-κB) διαμέσου των MAP κινασών [409, 410]. Συνεπώς, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο προκαλεί φλεγμονώδη διέγερση παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στα κύτταρα αυτά κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Συνεπώς, η άμεση προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηροθρόμβωσης (Εικόνα 3.2) [411].



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, που επάγει την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων, την αυξορύθμιση ενδοθηλιακών προσκολλητικών μορίων και την έκκριση μεταλλοπρωτεϊνασών.

Εκτός της απευθείας σύνδεσης των αιμοπεταλίων με τα ECs, αυτά μπορούν να προσκολληθούν και διαμέσου των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Αρχικά τα ουδετερόφιλα κυλούν πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο αφού η προσκόλληση διαμέσου της ενδοθηλιακής P-σελεκτίνης είναι χαλαρή. Σ' αυτή την προσκόλληση συμβάλλουν εκτός της P-σελεκτίνης και η L-σελεκτίνη που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων και η E-σελεκτίνη των ECs, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από κυτταροκίνες, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) [412]. Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενεργοποιημένα ECs έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση αυτών σε ισχυρούς ενεργοποιητές τους, όπως είναι ο PAF και οι χημειοκίνες της οικογένειας C-X-C (IL-8), οι οποίοι παράγονται από τα ECs. Όσον αφορά τον PAF, αυτός

Κεφάλαιο 3

μετά την παραγωγή του δεν εκκρίνεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένος στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, ασκώντας συνδετοκρινή δράση στα προσκολλημένα ουδετερόφιλα. Με αυτόν τον τρόπο ασκεί συνδετοκρινή δράση στα προσκολλημένα ουδετερόφιλα [413]. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην έκφραση της β2 ιντεγκρίνης (CD11b/CD18 ή MAC-1) στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων. Στη συνέχεια η CD11b/CD18 συνδέεται με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα του ICAM-1, με αποτέλεσμα τη σταθερή προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατόπιν πάνω στα ουδετερόφιλα μπορούν να προσκολληθούν τα ενεργοποιημένα Ρ-σελεκτίνης, σχηματίζοντας αιμοπετάλια διαμέσου της έτσι συσσωρεύματα αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Η δημιουργία των παραπάνω συσσωρευμάτων μπορεί να συμβεί και ανεξάρτητα από την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να συνδεθούν με τα ουδετερόφιλα διαμέσου γεφυρών ινωδογόνου, το οποίο αναγνωρίζεται τόσο από τον α_{IIb}β₃ των αιμοπεταλίων, όσο και από τον υποδογέα CD11b/CD18 των ουδετερόφιλων [414]. Έτσι, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα ECs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προσκολλούμενα και ενεργοποιώντας το ένα το άλλο διαμέσου της παραγωγής φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με οξέα στεφανιαία σύνδρομα, ένδειξη ότι η προσκόλληση αιμοπεταλίωνουδετερόφιλων-ECs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης όσο και στη ρήξη αθηρωματικής πλάκας [415, 416].

Τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να προσκολληθούν στα μονοκύτταρα διαμέσου της αλληλεπίδρασης της Ρ-σελεκτίνης και του PSGL-1. Στη συνέχεια η παραπάνω προσκόλληση σταθεροποιείται με την σύνδεση διαφόρων προσδετών των αιμοπεταλίων με το CD11b/CD18 (MAC-1) ή το GPIba ή/και με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (JAM-3, ICAM-2) [417, 418] και με το Fg δεσμευμένο στον α_{IIb}β₃. Με αυτόν τον τρόπο, τα αιμοπετάλια διεγείρουν την έκκριση χημειοκινών, κυτταροκινών και του TF από τα μονοκύτταρα, ενεργοποιούν υποδοχείς προσκόλλησης και πρωτεασών, ενώ επάγουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα (Εικόνα 3.3) [408]. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων και η φλεγμονώδης διέγερση που επακολουθεί, συμβάλει επίσης σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση της στρατολόγησης και της διέγερσης των μονοκυττάρων από τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο αιμοπετάλια.

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs)

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη φλεγμονή είναι μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα κύτταρα όπως τα EPCs. Τα EPCs έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας περισσότερο από οποιαδήποτε άλλα πρόδρομα κύτταρα, εξαιτίας της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε ώριμα ECs συμβάλλοντας στην αναγέννηση και την αγγειογένεση [419]. Σχετικά πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα EPCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και την αθηρογένεση και συμμετέχουν στους μηχανισμούς αποκατάστασης της αγγειακής βλάβης [420]. Έχει δειχθεί ότι, τα κυκλοφορούντα EPCs προσκολλώνται στα αιμοπετάλια τα οποία λειτουργούν ως γέφυρα για τη μεταφορά τους στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των EPCs προκαλώντας έτσι είτε επανενδοθηλιοποίηση και αποκατάσταση της βλάβης του ενδοθηλίου είτε τη μετατροπή αυτών σε αφρώδη κύτταρα (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Τα αιμοπετάλια επάγουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων σε ECs ή σε μακροφάγα/αφρώδη κύτταρα [419].

Πράγματι, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια διαμεσολαβούν στην στρατολόγηση των EPCs σε περιοχές βλάβης του ενδοθηλίου και είναι πιθανόν να οδηγούν στην επαναγένεση των ECs του αρτηριακού τοιχώματος. Αναλυτικότερα, μια πληθώρα από καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου ενεργοποιούν τα ECs, τα οποία οδηγούνται στην απόπτωση. Τα αποπτωτικά ECs απελευθερώνονται στην περιφερική κυκλοφορία, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη του υπενδοθηλιακού χώρου και της ECM η οποία αποτελείται κυρίως από το κολλαγόνο [319, 421]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν μια ποικιλία από υποδοχείς που τους επιτρέπουν την προσκόλλησή τους στην ECM, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα του κολλαγόνου, GPVI [415]. Μετά την προσκόλλησή τους, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και εκφράζουν μια πληθώρα από προσκολλητικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, όπως την Ρ-σελεκτίνη, τον SDF-1 και την ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα α_{Πb}β₃, οι οποίοι διευκολύνουν την στρατολόγηση των EPCs στην περιοχή της αγγειακής βλάβης [422, 423]. Τα EPCs δεν προσκολλώνται άμεσα στον υπενδοθηλιακό χώρο, αφού δεν εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς για το κολλαγόνο, τη φιβρονεκτίνη, το ινωδογόνο και τη βιτρονεκτίνη (π.χ. τον GPIb-V-IX ή τον GPVI). Στον ανθρώπινο οργανισμό η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα EPCs, οδηγεί σε μειωμένο αριθμό αποπτωτικών EPCs, άρα τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στην επιβίωση των EPCs [316]. Αποτέλεσμα αυτών είναι η διαφοροποίηση των EPCs σε ώριμα ECs (Εικόνα 3.5) [316, 422]. Παρόλα αυτά κάτω από παθοφυσιολογικές καταστάσεις, είναι δυνατόν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να επάγουν τη διαφοροποίηση των κυκλοφορούντων EPCs σε μακροφάγα. Αναλυτικότερα, κατόπιν ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια αρχικά κυλούν και μετά προσκολλώνται σταθερά πάνω στα άνω στα EC. Ακολουθεί η έκκριση προφλεγμονωδών μορίων όπως του CD40L και της IL-1β που ενεργοποιεί τα ECs. Η ενεργοποίηση των ECs, προκαλεί την περαιτέρω προσκόλληση, έκκριση και έκφραση στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων προσκολλητικών μορίων και τελικά την στρατολόγηση μονοκυττάρων και EPCs. Η ενδοκύττωση των αιμοπεταλίων από τα μονοκύτταρα και τα EPCs, οδηγεί τα τελευταία στη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα σε αρχική φάση και σε αφρώδη κύτταρα μετά, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας (Εικόνα 3.6) [319, 422]. Η πλήρης κατανόηση των παραπάνω μηχανισμών θα δημιουργήσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων για ασθενείς που εμφανίζουν υψηλό βαθμό κινδύνου για αθηροσκληρωτικές νόσους.



Εικόνα 3.5: Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα EPCs στην επαναγένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος (Τροποποιημένο από Stellos K., et al.) [319].



Εικόνα 3.6: Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα EPCs στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων (Τροποποιημένο από Stellos K., et al.) [319].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4[°]

Υλικά - Μέθοδοι

Μελέτη της έκφρασης των CD45, CD34 και KDR στο ολικό αίμα

Δείγμα

Χρησιμοποιείται φρέσκο αίμα, το οποίο συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 10 ml που περιέχουν αντιπηκτικό K₂EDTA (BD Vacutainer, 18.0 mg/ 10 ml αίματος).

Αρχή της μεθόδου

Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.τ.λ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Επίσης, αποτελεί μια ποσοτική, δυναμική και πολυπαραμετρική μέθοδος. Η κυτταρομετρία ροής σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθοριζόντων ιχνηθετών [424, 425]. Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο που χρησιμεύει για την ανίχνευση και τη μέτρηση του ποσού φθορίζουσας χρώσης επί σωματιδίων και αποτελείται από μια ή περισσότερες πηγές laser για την παροχή ενέργειας διέγερσης. Δυο ανιχνευτές μετρούν δύο φυσικές παραμέτρους των σωματιδίων ανεξάρτητα από τον φθορισμό και οι οποίες είναι: η πρόσθια σκέδαση (forward-angle light scatter) (FSC) που είναι ανάλογη με το μέγεθος του σωματιδίου και η πλάγια σκέδαση Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

(side-angle light scatter) (SSC) που είναι ανάλογη με την κοκκίωση των κυττάρων [424-426].

Για τη μέτρηση των δειγμάτων αυτό που απαιτείται αρχικά είναι το δείγμα να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος (αίμα, ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς). Κάθε κύτταρο μεγέθους μεταξύ 0.2-150 μικρόμετρα είναι κατάλληλο για ανάλυση. Τα προς εξέταση κύτταρα επισημαίνονται με ένα ή περισσότερα ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημανθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες ή χρωστικές και το δείγμα υφίσταται κατεργασία. Ουσιαστικά, ο στόχος είναι τα αντισώματα να συνδεθούν στην επιφάνεια των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Κατόπιν, τα κύτταρα εκπλένονται για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος και αναλύονται με το κυτταρόμετρο ροής. Το ποσό του φθορισμού και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Το επόμενο βήμα στην ανάλυση είναι ο προσδιορισμός των αντιγόνων των κυττάρων μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού, από τα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Οι χρωστικές οι οποίες χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm, είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC), η Perinidin Chrorophyl Protein (PerCP) και η φυκοερυθρίνη (PE) που εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530nm, 650 nm και 585nm αντίστοιχα [424-426].

Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως διαγράμματα δύο παραμέτρων (πλάγια σκέδαση ως προς πρόσθια σκέδαση) όπου τα κύτταρα διαχωρίζονται σε διάφορους πληθυσμούς ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση, ως διαγράμματα μεγέθους ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος, ως διαγράμματα δύο διαφορετικών φθοριοχρωμάτων ή ως ιστογράμματα όπου παρίστανται τα συμβάματα ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος.

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Κυτταρόμετρο Ροής FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Λογισμικό Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- BD FACSFlow (BD Biosciences)
- Anti-human CD34-FITC (BD Biosciences)
- Anti-human VEGFR2/KDR-PE (BD Biosciences)
- Anti-human CD45-PE (BD Biosciences)

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PBS, pH 7.4. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα λύσης, NH₄Cl. 0.417 g NH₄Cl, 0.05 g KHCO₃ και 0.0018 g K₂EDTA διαλυτοποιούνται σε 48 ml H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στα 50 ml με dH₂O. Το διάλυμα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη και διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Παίρνεται ολικό αίμα μέσα σε αποστειρωμένα σωληνάκια, που περιέχουν αντιπηκτικό K₂EDTA. Πολύ μικρή ποσότητα του ολικού αίματος θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της έκφρασης των CD45, CD34 και KDR στην περιοχή των MNCs με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Το υπόλοιπο PB θα αξιοποιηθεί για την απομόνωση και στη συνέχεια καλλιέργεια των MNCs για τη διαφοροποίησή τους προς EPCs.

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα λύσης NH₄Cl των κυττάρων το οποίο διατηρείται στους 4°C. Μετά, προετοιμάζονται τόσα ειδικά σωληνάκια πολυστυρενίου της Becton Dickinson, όσος είναι και ο αριθμός των δειγμάτων. Στα σωληνάκια, προστίθενται περιφερικά στο τοίχωμα κοντά στον πυθμένα διαδοχικά 5μl αντισώματος anti-CD34-FITC και 5μl αντισώματος anti-KDR-PE, με προσοχή ώστε να μην αναμιχθούν. Στη συνέχεια, στο κέντρο του πυθμένα προστίθενται 50μl ολικού αίματος. Αφού τα αντισώματα έχουν διαφορετικό φθοριόχρωμα, (FITC-, PE-) μπορούν να τοποθετηθούν στο ίδιο σωληνάκι. Αν τα αντισώματα έχουν ίδιο φθοριόχρωμα, τότε τοποθετούνται σε διαφορετικά σωληνάκια, γιατί το όργανο δεν τα αναγνωρίζει. Επιπλέον, σε διαφορετικά σωληνάκια προστίθενται 5μl αντισώματος anti-CD34-FITC και 5μl anti-CD45-PE. Κατόπιν, τα σωληνάκια αναδεύονται ήπια για την ανάμιξη των αντισωμάτων και του δείγματος. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min. Προστίθενται 2 ml διάλυμα λύσης για να λυθούν τα ερυθροκύτταρα και αφήνονται στον πάγο για 20 min. Στο διάστημα της αναμονής, ανοίγεται το κυτταρόμετρο ροής. Μετά το πέρας των 20min, γίνεται φυγοκέντρηση στις 2000rpm (670xg) για 5min για την καταβύθιση των κυττάρων, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl 10mM PBS σε κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και μετά την πειραματική πορεία ακολουθεί η κυτταρομετρία. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος πραγματοποιείται με χαμηλή ροή (12μl ± 3μl/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση των δεδομένων μέσω του λογισμικού Cell Quest του κυτταρομέτρου. Η κυτταρομετρική ανάλυση πραγματοποιείται στα 100.000 συμβάματα.

Τα κύτταρα που είναι διπλοθετικά ως προς την έκφραση των αντιγόνων CD34 και CD45 (CD34⁺/CD45⁺) είναι αιμοποιητικής προέλευσης, τα οποία εμφανίζουν περισσότερο πρόδρομο και όχι ενδοθηλιακό χαρακτήρα. Αντίθετα, τα κύτταρα που είναι διπλοθετικά ως προς την έκφραση των αντιγόνων CD34 και KDR (CD34⁺/KDR⁺) θεωρούνται ότι είναι τα EPCs που είναι στην κυκλοφορία, τα οποία εκφράζουν ενδοθηλιακό φαινότυπο.

Απομόνωση και καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος

Δείγμα

Χρησιμοποιείται φρέσκο αίμα, το οποίο συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 10 ml που περιέχουν αντιπηκτικό K₂EDTA. Συνολικά για κάθε παρασκευή χρησιμοποιούνται 20-30 ml αίμα.

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αποστειρωμένο διάλυμα Ficoll (Biocoll Separating Solution, 500 ml, Biochrom AG)
- Ανθρώπινη φιβρονεκτίνη (Human fibronectin, 1 mg, BD Biosciences)
- Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18 x 10 mm, Primaria Falcon)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ (Nuaire)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A.Krüss Optronic)
- Χρωστική Giemsa (Ferak Berlin)
- Αποστειρωμένα πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων (102 mm², Falcon, Becton Dickinson)

• Πλάκα Neubauer - Καλυπτρίδα

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα PBS 1X. 100 ml διαλύματος PBS 10X διαλύονται σε 900 ml αποστειρωμένου H₂O (water for injection). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποστειρωμένο διάλυμα EDTA (Titriplex III) 100X. 2g EDTA διαλύονται σε 80ml dH₂O κάνοντας ανάδευση με μαγνητάκι. Ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 53,7 mM αποστειρώνεται στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X-10% EDTA (PBS/EDTA 1:1). 990 ml PBS 1X και
 10 ml EDTA 100X αναμιγνύονται μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Η ανάμειξη
 γίνεται υπό στείρες συνθήκες. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα φιβρονεκτίνης 1 mg/ml. Η εμπορική συσκευασία περιέχει φιβρονεκτίνη (stock) σε λυοφιλοποιημένη μορφή (1 mg), η οποία διαλυτοποιείται σε 1 ml αποστειρωμένου dH₂O. Στη συνέχεια, το διάλυμα φιβρονεκτίνης διατηρείται στους -20°C σε κλάσματα των 45 μl (για 25 cm² φλάσκα), 20 μl (για 4 θέσεις των πλακιδίων των 24-well) ή 40 μl αντίστοιχα (για 2 θέσεις των πλακιδίων των 6-well) σε αποστειρωμένα eppendorf καλυμμένα με παραφίλμ, ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, οι παραπάνω ποσότητες αραιώνονται με dH₂O, έτσι ώστε να έχουμε τελικό διάλυμα συγκέντρωσης 9.9 μg/ml στο πλακίδιο καλλιέργειας.
- Διάλυμα χρώσης. Παρασκευάζεται με αραίωση της χρωστικής Giemsa με PBS 10 mM σε αναλογία 1:50 (10 μl χρωστικής Giemsa αραιώνονται με 490 μl PBS 10 mM). Η χρωστική φτιάχνεται λίγο πριν τη στιγμή της μέτρησης των κυττάρων.

Πειραματική διαδικασία

Όλη η διαδικασία απομόνωσης των MNCs γίνεται σε στείρες συνθήκες, στο χώρο ιστοκαλλιεργειών, στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Ο χώρος καθαρίζεται με 70% διάλυμα αιθανόλης πριν από τη χρήση του. Το αίμα συλλέγεται σε δύο-τρία αποστειρωμένα σωληνάκια των 10 ml (σύνολο 20-30 ml για κάθε πείραμα) που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτού στις 3100 rpm (1500xg) για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε φυγόκεντρο πάγκου για να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος. Ταυτόγρονα, 20 μl φιβρονεκτίνης (1 mg/ml) αραιώνονται σε 2 ml αποστειρωμένο dH₂O δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 9.9 μg/ml. Το διάλυμα εναποτίθεται σε πλακίδιο 6-well, όπου αναδεύεται σταυρωτά και αναμένουμε 90-120 min για την επίστρωση της ουσίας. Μετά την απομάκρυνση του πλάσματος, τα έμμορφα συστατικά του αίματος αποχύνονται σε κωνικό βαθμονομημένο αποστειρωμένο σωλήνα των 50 ml όπου αναμιγνύονται με PBS-EDTA μέχρι τελικού όγκου 25 ml. Με πλαστικό αποστειρωμένο σιφώνιο αναδεύεται ήπια το PBS-EDTA με το αίμα. Τα αραιωμένα έμμορφα των 25 ml επιστοιβάζονται με μεγάλη προσοχή σε 19 ml Ficoll που βρίσκονται σε αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα των 50 ml. Η επιστοίβαση γίνεται με πλαστικό αποστειρωμένο σιφώνιο των 5 ή 10 ml για να είναι πιο ομοιόμορφη γωρίς να υπάργει ενδεγόμενη διατάραξη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm (1000xg) για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στον πυθμένα του σωλήνα βρίσκονται τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Πάνω από αυτά, βρίσκονται επιστοιβασμένα τα αιμοπετάλια και περίπου στη μέση του σωλήνα υπάρχει ο δακτύλιος των μονοκυττάρων μαζί με τα λεμφοκύτταρα. Πάνω από αυτή υπάρχει διαυγές διάλυμα PBS το οποίο αφαιρείται με πιπέτα Pasteur υπό κενό. Στη συνέχεια, συλλέγεται κατά το δυνατόν ποσοτικά και χωρίς πολλές προσμίξεις με ερυθροκύτταρα η στοιβάδα των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, η οποία μεταφέρεται σε νέο κωνικό σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με διάλυμα PBS-EDTA και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500rpm (340xg) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκπλυση, αφαιρείται το υπερκείμενο υπό κενό και τα κύτταρα αναδιασπείρονται στα 50 ml με PBS-EDTA με τη βοήθεια πλαστικού αποστειρωμένου σιφωνίου. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 1300rpm (290xg) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκπλυση, αφαιρείται το υπερκείμενο υπό κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε PBS-EDTA μέχρι τα 50 ml και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 1000rpm (160xg) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη μέθοδο αυτή των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων απομακρύνονται κατά το

Υλικά - Μέθοδοι

δυνατόν ποσοτικά τα διαφόρων μεγεθών λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια που έχουν απομείνει μετά το Ficoll καθώς και τα μεμβρανικά υπολείμματα κατεστραμμένων κυττάρων. Σε όλες τις εκπλύσεις, η παρουσία του EDTA είναι απαραίτητη για την κατά το δυνατόν αποφυγή της ενεργοποίησης και συγκόλλησης των κυττάρων, τόσο μεταξύ τους όσο και στον πλαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο υπό κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε PBS χωρίς EDTA. Συμπληρώνεται ο όγκος του σωλήνα στα 50 ml και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 1000rpm (160xg) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα μετά την πάροδο 2 ωρών περίπου, αφαιρείται το διάλυμα της φιβρονεκτίνης από το πλακίδιο και βάζονται 2 ml περίπου PBS 1X, έτσι ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια. Μετά, αφαιρείται το ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετούνται ξανά 2 ml, αναδεύονται ήπια με σταυρωτή κίνηση του πλακιδίου και αφήνονται μέχρι να βάλουμε τα κύτταρα προκειμένου να μη στεγνώσει η φλάσκα.

Μέτρηση κυττάρων

90 μl χρωστική Giemsa αραιωμένη 1/50 (v/v) με 10 mM PBS (δηλαδή 10 μl Giemsa + 490 μl 10 mM PBS) και 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετούνται σε σωληνάκι eppendorf και αναδεύονται. 10 μl από το συνολικό εναιώρημα τοποθετείται και στις δύο πλευρές του αιματοκυττομέτρου Neubauer. Μετρούνται τα μεγάλα μόνο κύτταρα που είναι στην πλειοψηφία τους μονοκύτταρα. Ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα του πλήρους θρεπτικού μέσου Medium199 ή EGM-2 (αριθμός κυττάρων x 10⁵/ml) υπολογίζεται μετρώντας τα συνολικά κύτταρα που υπάρχουν στα 5 τετράγωνα (4 γωνιακά και το μεγάλο κεντρικό) διαιρούμενα με το 5 (σύνολο των τετραγώνων) και πολλαπλασιαζόμενα με τον αριθμό 10⁵ (Εικόνα 4.1).
Τετράγωνο της πλάκας Αιμακυτταρομέτρου



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση τετραγώνου της πλάκας αιμοκυτταρομέτρου.

Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων και διαφοροποίηση προς colony forming unit-Hill (CFU-Hill) κύτταρα

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θρεπτικό μέσο Medium 199 1X (500 ml, Gibco BRL Life Technologies)
- Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (10,000 Units/ml Penicillin/ 10,000 μg/ml Streptomycin, 100X, PAA)
- Ορός από έμβρυο βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Bovine Serum, FBS heat inactivated, Cibco BRL Life Technologies)
- Ανθρώπινη φιβρονεκτίνη (Human fibronectin, 1 mg, BD Biosciences)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 και 50 ml (Corning)
- Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18 x 10 mm, Primaria Falcon)

Διαλύματα εργασίας

 Θρεπτικό μέσο Medium 199/ 20% FBS/ 1% Penicillin/Streptomycin (πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199). Σε 39,5 ml Medium 199 1X με Earle's salt και Lγλουταμίνη προστίθενται 10 ml FBS και 0,5 ml Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη. Η ανάμιξη γίνεται υπό στείρες συνθήκες και το τελικό διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση. Τέλος, φυλάσσεται στο ψυχρό θάλαμο στους 4°C και μπορεί να διατηρηθεί για 1 μήνα.

- Διάλυμα PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα φιβρονεκτίνης 1 mg/ml. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Πειραματική διαδικασία

Πρέπει να σημειωθεί ότι, όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες. Στην περίπτωση της διαφοροποίησης των MNCs προς CFU-Hill (5 x 10⁶ κύτταρα/ θέση του 6-well), τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου Medium 199 και τοποθετούνται στο πλακίδιο αφού αφαιρεθεί πρώτα το διάλυμα έκπλυσης. Έτσι, τα κύτταρα είναι έτοιμα για καλλιέργεια και τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης. Την τρίτη μέρα καλλιέργειας παίρνεται φιβρονεκτίνη και αραιώνεται ο όγκος της σε αποστειρωμένο dH₂O, ώστε να προκύψει διάλυμα 9.9 μg/ml. Αφού αναδεύεται σε ένα κωνικό σωλήνα των 15 ml, το διάλυμα φιβρονεκτίνης τοποθετείται σε ένα πλακίδιο Petri των 24 θέσεων, όπου αναμένουμε 90-120 min για την επίστρωση της ουσίας. Στη συνέχεια, τα μη προσκολλημένα κύτταρα κατά τη διάρκεια της αναμονής συλλέγονται και μετρούνται σε μικροσκόπιο με τη χρωστική Giemsa, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά, απομακρύνεται το διάλυμα φιβρονεκτίνης από τις θέσεις των πλακιδίων με αναρρόφηση υπό κενό με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις των συγκεκριμένων well με PBS 1X για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος φιβρονεκτίνης. Μετά την τελευταία έκπλυση, τα κύτταρα αφού αραιώνονται με το πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Medium 199 (τελική συγκέντρωση 1 x 10^6 κύτταρα/well), αφήνονται να κολλήσουν στον πυθμένα των θέσεων του πλακιδίου. Σε κάθε θέση του πλακιδίου των 24 θέσεων, τοποθετείται συνολικά 1 ml κυττάρων συγκέντρωσης 1 x 10⁶ κύτταρα/well. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στους 37°C σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO2. Μετά από 2 μέρες καλλιέργειας, πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης. Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο με αναρρόφηση υπό κενό με πιπέτα Pasteur. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με PBS 1X για την απομάκρυνση των κυττάρων που είναι στο υπερκείμενο. Αμέσως μετά προστίθεται 1 ml θρεπτικού μέσου στο πλακίδιο των 24 θέσεων (σε κάθε θέση) και τοποθετούνται στους 37°C σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά από 2 μέρες καλλιέργειας. Μετά από 2 μέρες (9^η μέρα καλλιέργειας) ακολουθεί ο κυτταρομετρικός χαρακτηρισμός των CFU-Hill κυττάρων.

Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων και διαφοροποίηση προς κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs)

Αντιδραστήρια - Όργανα

- 1 Kit καλλιέργειας το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:
- Βασικό θρεπτικό μέσο των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell Basal Medium-2, EBM-2, 500 ml, Lonza)
- 2. Ορός από έμβρυο βοδιού, (Foetal Bovine Serum, FBS, 10 ml, Lonza)
- **3.** Υδροκορτιζόνη (Hydrocortizone, 0.5 ml, Lonza)
- **4.** Αυξητικός παράγοντας Β των ανθρώπινων ινοβλαστών (human Fibroblast Growth Factor-B, hFGF-B, 2 ml, Lonza)
- 5. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 6. Αυξητικός παράγοντας R3 που είναι παρόμοιος με την ινσουλίνη (R3 Insulin like growth factor, R3-IGF-1, 0.5ml, Lonza)
- **7.** Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, 0.5 ml, Lonza)
- 8. Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (hEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 9. Γενταμυκίνη, Αμφοτερικίνη Β (GA-1000, 0.5 ml, Lonza)
- 10. $H\pi\alpha\rho$ ivų (Heparin, 0.5 ml, Lonza)

Διαλύματα εργασίας

Θρεπτικό μέσο EGM-2: Στα 500 ml θρεπτικού EBM-2 προστίθενται οι αυξητικοί παράγοντες υδροκορτιζόνη, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ασκορβικό οξύ, hEGF, GA-1000, FBS και η ηπαρίνη. Το τελικό διάλυμα αναδεύεται και είναι έτοιμο για χρήση. Τέλος, φυλάσσεται στους 4°C στο ψυχρό θάλαμο και μπορεί να διατηρηθεί για 1-2 μήνες.

 Διάλυμα PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Πειραματική διαδικασία

Στην περίπτωση της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων προς CACs (10 x 10^6 κύτταρα/ θέση του 6-well), τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 2 ml θρεπτικού μέσου EGM-2 και όχι πλήρους θρεπτικού μέσου Medium 199, όπως στα CFU-Hill. Τα κύτταρα είναι έτοιμα για καλλιέργεια και τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης. Συγκεκριμένα, μετά από τέσσερις μέρες καλλιέργειας των MNCs με το EGM-2, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο με αναρρόφηση υπό κενό με πιπέτα Pasteur. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με PBS 1X για την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν είναι κολλημένα. Αμέσως μετά προστίθενται 10 ml θρεπτικού μέσου στο τρυβλίο των 57 cm² και τοποθετούνται στους 37°C σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂. Μετά από 2-3 μέρες καλλιέργειας, τα CACs κύτταρα έχουν σχηματιστεί και γίνεται ο χαρακτηρισμός τους με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής.

Απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων από αίμα από ομφάλιο λώρο

Μέθοδος μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού (MACS)

Αρχή της μεθόδου

Ο μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων (Magnetic cell sorting ή MACS) είναι μια μέθοδος διάκρισης διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών, η οποία βασίζεται στα αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία αναπτύχθηκε από την εταιρεία Miltenyi Biotec και αξιοποιεί τη MACS τεχνολογία, η οποία θεωρείται η «gold standard» τεχνική για την απομόνωση των κυττάρων. Η συγκεκριμένη τεχνολογία βασίζεται στα MACS υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια (μικροσφαιρίδια), στις MACS στήλες διαχωρισμού και τέλος στους MACS διαχωριστές (τα όργανα στα οποία πραγματοποιείται η διαδικασία του διαχωρισμού). Η MACS μεθοδολογία συνεισφέρει στην ήπια απομόνωση βιώσιμων και λειτουργικά ενεργών κυττάρων, στην πολύ καλή

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

καθαρότητα και ανάκτηση σπάνιων κυττάρων και τέλος στην ανάπτυξη ευέλικτων στρατηγικών διαχωρισμού των κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθείται στην πειραματική μας πορεία προκειμένου να αποκτηθούν καθαροί κυτταρικοί πληθυσμοί είναι η άμεση μαγνητική επισήμανση. Αρχικά, τα κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα επισημαίνονται μαγνητικά με τα μικροσφαιρίδια (microbeads). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα και φέρουν αντιγόνα στην επιφάνειά τους δεσμεύονται με μεγάλη εξειδίκευση σε μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με τα MACS μικροσφαιρίδια. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε μια MACS στήλη, η οποία εφαρμόζεται στο μαγνητικό πεδίο ενός MACS διαχωριστή. Τα μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα κατακρατούνται μέσα στη στήλη. Αντίθετα, τα μη επισημασμένα κύτταρα διέρχονται από τη στήλη, οπότε το συγκεκριμένο κυτταρικό κλάσμα που συλλέγεται δεν είναι εμπλουτισμένο με τα κύτταρα που επιθυμούμε να απομονώσουμε (κύτταρα-στόχοι). Τέλος, μετά από το στάδιο των εκπλύσεων, η στήλη απομακρύνεται από το μαγνητικό πεδίο του MACS διαχωριστή και τα κατακρατημένα κύτταρα μπορούν να εκλουστούν από τη στήλη με τη βοήθεια ενός εμβόλου. Το συγκεκριμένο κλάσμα που συλλέγεται είναι εμπλουτισμένο με τον κυτταρικό πληθυσμό που μας ενδιαφέρει να ταυτοποιήσουμε. Ολόκληρη η πειραματική διαδικασία, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 4.2 μπορεί να ολοκληρωθεί περίπου σε 30 λεπτά.



Εικόνα 4.2: Απεικόνιση των τριών σταδίων της τεχνολογίας του μαγνητικού διαχωρισμού.

Έτσι, με τη τεχνολογία των MACS μικροσφαιριδίων, τόσο τα επισημασμένα όσο και τα μη επισημασμένα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν με υψηλή καθαρότητα και μεγάλο ποσοστό ανάκτησης και να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε διάφορες εφαρμογές.

Περιγραφή των υλικών και των συσκευών που χρησιμοποιούνται στο μαγνητικό διαχωρισμό

MS στήλες

Οι MS στήλες έχουν αναπτυχθεί για την ήπια απομόνωση των επισημασμένων με μικροσφαιρίδια κυττάρων (Εικόνα 4.3). Επειδή τα μικροσφαιρίδια είναι μικρά υπερπαραμαγνητικά μόρια, ένα μαγνητικό πεδίο υψηλής βαθμίδωσης απαιτείται για την κατακράτηση των επισημασμένων κυττάρων. Οι MS στήλες περιέχουν ένα βελτιωμένο υλικό, το οποίο συνεισφέρει στη δημιουργία ενός ισχυρού μαγνητικού πεδίου όταν τοποθετούνται σε ένα μόνιμο μαγνήτη, όπως είναι ο MACS διαχωριστής.

Οι MACS στήλες περιλαμβάνουν ένα υλικό που αποτελείται από σιδηρομαγνητικά σφαιρίδια, καλυμμένα με μια υδρόφιλη επίστρωση, η οποία είναι φιλική προς τα κύτταρα και επιτρέπει τη γρήγορη πλήρωσή τους. Αυτή η επένδυση εκπλένεται τοποθετώντας μέσα στη στήλη ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα πριν την έναρξη του διαχωρισμού. Όταν τοποθετούνται στο μαγνητικό διαχωριστή, τα σφαιρίδια ενισχύουν το μαγνητικό πεδίο μέχρι 10.000 φορές, προκαλώντας μία υψηλή βαθμίδωση μέσα στη στήλη. Αυτό είναι σημαντικό για την απομόνωση των κυττάρων, τα οποία επισημαίνονται σε μικρό βαθμό, αφήνοντας έτσι αρκετούς επίτοπους ελεύθερους για να γίνει ταυτόχρονη χρώση των αντισωμάτων. Η χωρητικότητα των στηλών είναι από 1 x 10⁷ μέχρι 2 x 10⁸ μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα. Οι στήλες MS χρησιμοποιούνται αποκλειστικά και μόνο μία φορά κατά την πειραματική διαδικασία.

94



Εικόνα 4.3: Απεικόνιση της MS στήλης και του εμβόλου της.

Διαχωριστές MACS

Επειδή τα μικροσφαιρίδια είναι εξαιρετικά μικρά, η ποσότητα του μαγνητίσιμου υλικού που περιβάλλει τα κύτταρα δεν είναι μεγάλη. Ωστόσο χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές, οι MACS διαχωριστές, οι οποίες δημιουργούν ένα μαγνητικό πεδίο υψηλής βαθμίδωσης αρκετά ισχυρό ώστε να μπορεί να συγκρατεί τα ταυτοποιημένα κύτταρα (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Διάταξη ενός MACS διαχωριστή με το μαγνήτη και τη στήλη.

Κεφάλαιο 4

Η τεχνολογία MACS χρησιμοποιεί υψηλά βαθμονομημένες μαγνητικές μονάδες κυτταρικού διαχωρισμού που αποτελούνται από έναν ισχυρό μόνιμο μαγνήτη (0,4-1 tesla) και μια διαχωριστική στήλη με ένα περίβλημα από σιδηρομαγνητικά σφαιρίδια. Για να αποφευχθεί η διάβρωση ή η πιθανή καταστροφή των κυττάρων εξαιτίας της άμεσης επαφής με το υλικό του περιβλήματος, αυτό επικαλύπτεται με ένα λεπτό πλαστικό στρώμα πολυμερούς. Όταν οι στήλες τοποθετούνται ανάμεσα στους πόλους του μαγνήτη του διαχωριστή MACS υψηλές μαγνητικές μεταβολές πραγματοποιούνται γύρω από το σιδηρομαγνητικό περίβλημα. Η μαγνητική δύναμη είναι αρκετή να συγκρατήσει τα κύτταρα-στόχους που ταυτοποιήθηκαν μαζί με ένα μικρό αριθμό μικροσφαιριδίων. Όταν η στήλη απομακρύνεται από τον μαγνήτη, το περίβλημά της απομαγνητίζεται γρήγορα και τα κύτταρα που κατακρατήθηκαν μπορούν εύκολα και εξ' ολοκλήρου να εκλουστούν απλώς ξεβγάζοντας την στήλη με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα.

MACS μικροσφαιρίδια

Τα MACS μικροσφαιρίδια είναι υπερπαραμαγνητικά μόρια διαμέτρου 50 νανομέτρων (nm), τα οποία είναι συζευγμένα σε αντισώματα με μεγάλη εξειδίκευση έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου που υπάρχει πάνω στην κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 4.5). Υπερπαραμαγνητικά μόρια σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα σωματίδια παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες μόνο εφόσον υπάρχει εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, όπου οι πυρήνες του οξειδίου του σιδήρου μαγνητίζονται ισχυρά. Επίσης, μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν από ένα εναιώρημα με έναν απλό μαγνητικό διαχωριστή. Τα σωματίδια όταν απομακρύνονται από το μαγνητικό πεδίο δεν διατηρούν καθόλου μαγνητισμό.

Τα σωματίδια αποτελούνται από οξείδιο του σιδήρου στον πυρήνα και ένα επικαλυπτικό στρώμα από δεξτράνη. Τα μόρια σιδήρου-δεξτράνης προσδίδουν πολυάριθμα μοναδικά χαρακτηριστικά στην τεχνολογία MACS. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, τα μικροσφαιρίδια δεν ενεργοποιούν τα κύτταρα και δεν καλύπτουν τους επίτοπους της κυτταρικής επιφάνειας. Επιπλέον, είναι μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα, οπότε δεν μεταβάλουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα σφαιρίδια, τα MACS μικροσφαιρίδια που είναι σε μέγεθος νανομέτρων, δεν χρειάζεται να απομακρυνθούν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, τα μικροσφαιρίδια βρίσκονται πάντα σε εναιώρημα (κολλοειδές διάλυμα), επιτρέποντας με

96

αυτόν τον τρόπο ταχεία κινητική δέσμευσης και σύντομες διαδικασίες επισήμανσης. Αντίθετα, στην περίπτωση των μη κολλοειδών διαλυμάτων ή των πολύ μεγάλων σφαιριδίων, υπάρχει μεγάλος κίνδυνος σφαλμάτων λόγω δημιουργίας συσσωματωμάτων των κυττάρων. Τέλος, η λειτουργικότητα των κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από την κυτταρική επιφάνεια του αντιγόνου-στόχου και από το βαθμό της διασταύρωσης τους με τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με τα μικροσφαιρίδια και όχι στα μικροσφαιρίδια αυτά καθ' εαυτά.



Εικόνα 4.5: Σχήμα MACS μικροσφαιριδίων.

Το διάστημα ανάμεσα στα σφαιρίδια είναι μεγάλο, οπότε τα πρωτογενή κύτταρα, όπως επίσης και τα περισσότερα καλλιεργήσιμα κύτταρα μπορούν να διέρχονται ελεύθερα διαμέσου της στήλης. Τα μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα διατηρούνται σε εναιώρημα μέσα στη στήλη και ουσιαστικά δεν «δεσμεύονται» στο υλικό της στήλης. Επειδή τα κύτταρα βρίσκονται σε εναιώρημα ελαχιστοποιείται η πιθανότητα δημιουργίας στρες και επιτρέπεται να γίνει αποτελεσματική πλύση υπό στείρες συνθήκες αποφεύγοντας έτσι τη συσσώρευση των κυττάρων.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- 1 Kit καλλιέργειας το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:
- Βασικό θρεπτικό μέσο των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell Basal Medium-2, EBM-2, 500 ml, Lonza)
- 2. Ορός από έμβρυο βοδιού, (Foetal Bovine Serum, FBS, 10 ml, Lonza)
- **3.** Υδροκορτιζόνη (Hydrocortizone, 0.5 ml, Lonza)
- 4. Αυξητικός παράγοντας Β των ανθρώπινων ινοβλαστών (human Fibroblast Growth Factor-B, hFGF-B, 2 ml, Lonza)
- 5. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 6. Αυξητικός παράγοντας R3 που είναι παρόμοιος με την ινσουλίνη (R3 Insulin like growth factor, R3-IGF-1, 0.5ml, Lonza)
- **7.** Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, 0.5 ml, Lonza)
- 8. Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (hEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 9. Γενταμυκίνη, Αμφοτερικίνη Β (GA-1000, 0.5 ml, Lonza)
- **10.** Ηπαρίνη (Heparin, 0.5 ml, Lonza)
- Μικροσφαιρίδια CD34 (2 ml CD34 Microbeads, human, Miltenyi Biotec)
- Αντιδραστήριο FcR Blocking (2 ml FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec)
- Anti-CD34-FITC (BD Biosciences)
- Anti-CD45-PE (BD Biosciences)
- Mouse anti-human IgG2a-FITC (BD Biosciences)
- Mouse anti-human IgG2a-PE (BD Biosciences)

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Αποστειρωμένο διάλυμα EDTA 100Χ. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS/20mM EDTA. 7,4 ml EDTA 100X αναμιγνύονται με 12,6 ml PBS 1X, δίνοντας διάλυμα τελικού όγκου 20 ml. Το συνολικό διάλυμα μοιράζεται σε τέσσερις κωνικούς σωλήνες των 50 ml. Οπότε, η συγκέντρωση του

αντιπηκτικού στο σωλήνα θα υποδιπλασιαστεί (2mM) όταν προστεθεί ποσότητα αίματος από τον ομφάλιο λώρο (συνολικός όγκος 50 ml). Το τελικό διάλυμα αποθηκεύεται στο ψυχρό θάλαμο στους 4°C.

- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS/2mM EDTA. 26,1 ml EDTA 100X αναμιγνύονται με 673,9 ml PBS 1X δίνοντας διάλυμα τελικού όγκου 700 ml. Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται στο ψυχρό θάλαμο στους 4°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X-10% EDTA (PBS/EDTA 1:1). Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Θρεπτικό μέσο EGM-2: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα φιβρονεκτίνης 1 mg/ml. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα χρώσης. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS/2mM EDTA/0,5% BSA: Παρασκευάζεται ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 1X, pH 7.2), 0.5% αλβουμίνης από ορό βοοειδών (BSA) και 2 mM EDTA. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται κρύο (2-8 °C). Πρέπει να γίνει απαέρωση του διαλύματος πριν τη χρήση, επειδή οι φυσαλίδες αέρα μπορεί να μπλοκάρουν τη στήλη. Το BSA μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες πρωτείνες, όπως η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, ο ανθρώπινος ορός ή ο ορός από έμβρυο βοδιού. Επιπλέον, ρυθμιστικά διαλύματα ή θρεπτικά μέσα ανάπτυξης, τα οποία περιέχουν ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) ή μαγνησίου (Mg²⁺) δεν συνιστώνται για χρήση.

Πειραματική διαδικασία

Αρχή μεθόδου

Η μαγνητική επισήμανση που εφαρμόζεται στα πειράματα μας είναι η άμεση και η στρατηγική διαχωρισμού η θετική επιλογή. Η εμπορική συσκευασία με τα CD34 μικροσφαιρίδια περιλαμβάνει τα μικροσφαιρίδια, τα οποία είναι άμεσα συζευγμένα με τα CD34⁺ αντισώματα προκειμένου να γίνει η μαγνητική επισήμανση των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη CD34. Τα CD34⁺ κύτταρα μπορεί να προέρχονται από το PB, το

Υλικά - Μέθοδοι

CB, το BM και τα διαφοροποιημένα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα HPCs, τα οποία εντοπίζονται σε ποσοστό 0,05-0,2% στο PB, 0,1-0,5% στο CB και 0,5-3% στο BM μπορούν να εμπλουτιστούν γρήγορα και αποτελεσματικά.

Το πείραμα πρέπει να εκτελείται γρήγορα, όπου τα κύτταρα καθώς και τα διαλύματα διατηρούνται στους 4°C. Αυτό γίνεται για να παρεμποδιστεί η δέσμευση των αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς και η μη ειδική επισήμανση των κυττάρων. Οι όγκοι για τη μαγνητική επισήμανση που δίνονται παρακάτω είναι για μέχρι 10⁸ συνολικά κύτταρα. Όταν δουλεύουμε με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, αυξάνονται αναλογικά όλοι οι όγκοι των αντιδραστηρίων και οι συνολικοί όγκοι. Η συνιστώμενη θερμοκρασία επώασης είναι 2-8°C. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες ή/και οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης μπορούν να οδηγήσουν σε μη εξειδικευμένη επισήμανση των κυττάρων.

Προετοιμασία των κυττάρων του αίματος από ομφάλιο λώρο

Το αίμα, το οποίο συλλέγεται από το CB πρέπει να χρησιμοποιηθεί άμεσα και όχι αργότερα από 4 ώρες. Το αίμα πρέπει να τοποθετηθεί άμεσα σε ένα σωλήνα των 50 ml, o οποίος θα περιέχει 5 ml PBS 1X συμπληρωμένα με 20 mM EDTA, προκειμένου να μην γίνει η πήξη του αίματος. Η τελική συγκέντρωση του αντιπηκτικού στο συνολικό διάλυμα των 50 ml είναι 2 mM EDTA. Το CB αποθηκεύεται στους 4°C μέχρι να ξεκινήσει ο διαχωρισμός. Η ποσότητα του αίματος μοιράζεται σε 5 κωνικούς σωλήνες των 50 ml. Στη συνέχεια, το αίμα αραιώνεται σε αναλογία 1:4 με PBS/2mM EDTA (π.γ. 10 ml αίμα + 30 ml PBS/2mM EDTA). Στη συνέχεια, 15 ml Ficoll τοποθετούνται σε ένα σωλήνα των 50 ml και 35 ml του παραπάνω αραιωμένου κυτταρικού εναιωρήματος επιστοιβάζονται προσεκτικά. Η διαδικασία της επιστοίβασης συνίσταται να γίνει με πλαστικό σιφώνιο των 5 ή 10 ml, ώστε ο διαχωρισμός να γίνει ομοιόμορφα και να αποφευχθεί οποιαδήποτε διατάραξη. Οι κωνικοί σωλήνες των 50 ml φυγοκεντρούνται στα 400xg για 35 λεπτά στους 20°C σε μια φυγόκεντρο χωρίς τη χρήση φρένου. Αξίζει να σημειωθεί ότι, δεν υπάρχει πρόβλημα η φυγοκέντρηση να γίνει σε ακόμη μεγαλύτερα g, 800 ή και 1000xg, αφού με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η απόκτηση ενός πιο ευδιάκριτου πληθυσμού MNCs, ιδιαίτερα όταν το αίμα προέρχεται από τον CB. Στη συνέχεια, αναρροφείται η πάνω στοιβάδα με τη χρήση πιπέττας Pasteur αφήνοντας τη στοιβάδα των MNCs αδιατάραχτη στη μεσόφαση. Μεταφέρονται προσεκτικά τα κύτταρα της μεσόφασης

100

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

(λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και θρομβοκύτταρα) σε ένα νέο κωνικό σωλήνα των 50 ml. Ο κωνικός σωλήνας συμπληρώνεται μέχρι τα 50 ml με PBS/2mM EDTA, γίνεται ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 300xg για 10 λεπτά στους 20°C για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του οργανικού πολυμερούς Ficoll. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο πλήρως με τη χρήση πιπέττας Pasteur υπό κενό. Στη συνέχεια, ο κωνικός σωλήνας συμπληρώνεται ξανά με PBS/2mM EDTA μέχρι τα 50 ml. Γίνεται ανάδευση των κυττάρων με το διάλυμα και φυγοκέντρηση ξανά στα 200xg για 10 λεπτά στους 20°C. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο πλήρως. Στη συνέχεια, προστίθεται πάλι ένας μικρός όγκος PBS/2mM EDTA (10-20 ml), αναδιασπείρονται τα κύτταρα και κατόπιν συμπληρώνονται μέχρι τα 50 ml. Το συνολικό διάλυμα αναδεύεται καλά και παίρνεται ποσότητα κυττάρων, προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία μέτρησης τους σύμφωνα με την παράγραφο Μέτρηση των κυττάρων, που αναλύεται παραπάνω. Τέλος, πραγματοποιείται άλλη μια φυγοκέντρηση στα 200xg για την καλύτερη κατά το δυνατόν απομάκρυνση των αιμοπεταλίων. Με τη μέθοδο αυτή των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων απομακρύνονται κατά το δυνατόν ποσοτικά τα διαφόρων μεγεθών λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια που έχουν απομείνει μετά το Ficoll καθώς και τα μεμβρανικά υπολείμματα κατεστραμμένων κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η αύξηση του βαθμού καθαρότητας του διαγωρισμού των CD34⁺ κυττάρων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, γίνεται επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε ένα τελικό όγκο 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS/2mM EDTA/0.5% BSA για μέχρι 0,5x10⁸ συνολικά κύτταρα. Ακολουθεί το στάδιο της μαγνητικής επισήμανσης.

Μαγνητική επισήμανση

Το πείραμα γίνεται γρήγορα, τα κύτταρα διατηρούνται σε κρύο περιβάλλον (2-8°C) και χρησιμοποιούνται διαλύματα, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους 4°C. Αυτό θα εμποδίσει τη δέσμευση των αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και την μη-ειδική κυτταρική επισήμανση. Οι όγκοι που δίνονται παρακάτω για τη μαγνητική επισήμανση είναι για μέχρι 1×10^8 συνολικά κύτταρα. Όταν δουλεύουμε με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, προσαρμόζουμε όλους τους όγκους των αντιδραστηρίων και τους συνολικούς όγκους αναλόγως (π.χ. για 2×10^8 συνολικά κύτταρα, χρησιμοποιείται ο διπλάσιος όγκος από όλους τους υποδεδειγμένους όγκους αντιδραστηρίων και τους συνολικούς.

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

Αρχικά, γίνεται ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται το κυτταρικό εναιώρημα στα 300xg (1282 rpm) για 10 min και μετά απομακρύνεται το υπερκείμενο πλήρως. Κατόπιν, επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα (0,5 x 10⁸ κύτταρα/ml) στα 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS/2mM/0,5% BSA. Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μl αντιδραστηρίου FcR blocking και 100 μl μικροσφαιριδίων CD34. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επωάζονται στους 2-8°C για 30 min. Κατόπιν, παίρνεται μικρή ποσότητα κυττάρων (20 μl) και τοποθετούνται σε ένα σωληνάκι κυτταρομετρίας ροής, όπου προστίθενται 2 μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD34-FITC και anti-CD45-PE και επωάζονται για ακόμη 10 min στο ψυγείο. Η συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθείται για να γίνει κυτταρομετρική ανάλυση των MNCs πριν την έναρξη του μαγνητικού διαχωρισμού. Ο συνολικός όγκος των κυττάρων μετά την επώαση εκπλένεται προσθέτοντας 5-10 ml ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για μέχρι 10⁸ κύτταρα και φυγοκεντρούνται στα 300xg (1337 rpm). Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και προστίθενται 500 μl buffer. Τέλος, προχωράμε στη διαδικασία του μαγνητικού διαχωρισμού.

Μαγνητικός διαχωρισμός

Προετοιμασία των στηλών MS

- 1. Η στήλη τοποθετείται στο μαγνητικό πεδίο του MACS διαχωριστή.
- 2. Προετοιμάζεται η στήλη κάνοντας εκπλύσεις με buffer, όπου 500 μl απαερωμένου διαλύματος τοποθετείται στην κορυφή της στήλης και αφήνεται να "τρέξει". Οι στήλες MS δεν μπορούν να τρέξουν αν είναι στεγνές. Το buffer συλλέγεται σε ένα σωληνάκι των 15 ml.
- 3. Αφού συλλεχθεί το buffer, τοποθετείται νέο tube των 15 ml κάτω από τη στήλη. Η στήλη τώρα είναι έτοιμη για μαγνητικό διαχωρισμό. Η στήλη χρησιμοποιείται άμεσα μετά το "γέμισμα" (με τα 500 μl buffer) για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων αέρα κατά το ζέσταμα. Ο χρόνος για την "πλήρωση" της στήλης με buffer εξαρτάται από τις συνθήκες αποθήκευσης, τη θερμοκρασία και την υγρασία. Για αυτό, ο χρόνος μπορεί να ποικίλλει από λίγα δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά. Ο χρόνος πλήρωσης δεν έχει καμία επίδραση στην ποιότητα του διαχωρισμού.

Μαγνητικός διαχωρισμός με MS στήλες

- 1. Τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα των 500 μl πάνω στη στήλη.
- Συλλέγονται τα μη επισημασμένα κύτταρα, τα οποία διέρχονται από τη στήλη σε ένα tube των 15 ml.
- 3. Η στήλη MS εκπλένεται με απαερωμένο buffer (PBS 2mM/0,5% BSA/EDTA) 3 φορές x 500 μl, προσθέτοντας νέο buffer κάθε φορά που η δεξαμενή της στήλης έχει μικρή ποσότητα διαλύματος. Συλλέγεται το συνολικό διάλυμα που τρέχει από τη στήλη, όπου αυτό είναι το μη επισημασμένο κυτταρικό κλάσμα.
- Απομακρύνεται η στήλη από τον διαχωριστή και τοποθετείται γρήγορα σε ένα σωληνάκι των 15 ml.
- 5. Τέλος, τοποθετείται 1 ml buffer πάνω στη στήλη MS. Ξεπλένεται άμεσα το κλάσμα με τα μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα πιέζοντας σταθερά το έμβολο που παρέχεται με τη στήλη.

Σε περίπτωση που επιθυμούμε αυξημένη καθαρότητα των CD34⁺ κυττάρων, πραγματοποιείται μαγνητικός διαχωρισμός και με δεύτερη στήλη.

Εκτίμηση της καθαρότητας των CD34⁺ κυττάρων

Η καθαρότητα των απομονωμένων CD34⁺ μπορεί να αξιολογηθεί με την κυτταρομετρία ροής. Για τη βέλτιστη διάκριση των CD34⁺ κυττάρων από τα άλλα λευκοκύτταρα, γίνεται χρώση των κυττάρων με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD45. Τα CD34⁺ κύτταρα εκφράζουν CD45 σε μειωμένο βαθμό σε σύγκριση με τα λεμφοκύτταρα.

Παίρνονται 20 μl MNCs πριν το μαγνητικό διαχωρισμό και προστίθενται 80 μl PBS 1X σε ένα σωληνάκι κυτταρομέτρου. Στη συνέχεια, παίρνεται ποσότητα 2 μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και από τα ισοτυπικά control IgG2a-FITC και IgG2a-PE και τοποθετούνται μέσα στο διάλυμα. Κατόπιν, γίνεται ανάδευση με το χέρι και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 2-8°C. Προστίθεται 1 ml επιπλέον PBS 1X και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 rpm (670xg) για 5 λεπτά για να γίνει η έκπλυση της περίσσειας των αντισωμάτων. Μετά, γίνεται ήπια απόχυση και αναδιασπορά σε 500 μl κρύου PBS 1X και ακολουθεί κυτταρομετρική ανάλυση (Εικόνα 4.6A, B, Γ).

Υλικά - Μέθοδοι

Από τη στιγμή που γίνεται ο μαγνητικός διαχωρισμός και μετά, σε όλες τις διαδικασίες χρησιμοποιούνται 50 μl κύτταρα, οπότε και 5 μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα που προαναφέρθηκαν. Στη συνέχεια, έγινε κυτταρομετρική ανάλυση των κυττάρων που απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό χρησιμοποιώντας την πρώτη στήλη (Εικόνα 4.7A, B, Γ). Επιπλέον, μελετήθηκε με τη συγκεκριμένη τεχνική το συνολικό κλάσμα των μη επισημασμένων κυττάρων που προέρχονται από την πρώτη στήλη διαχωρισμού (Εικόνα 4.8A, B, Γ). Προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητα των συγκεκριμένων κυττάρων, χρησιμοποιείται και δεύτερη στήλη όπου εκλούονται τα κύτταρα με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (Εικόνες 4.9A, B, Γ και 4.10A, B, Γ).



Εικόνα 4.6A, B, Γ: A) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ μονοπύρηνων κυττάρων αίματος από ομφάλιο λώρο πριν το μαγνητικό διαχωρισμό. B) Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα όπου φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR) στα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και στα ισοτυπικά IgG2a-FITC και IgG2a-PE.



Εικόνα 4.7A, B, Γ: A) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ πληθυσμού των επισημασμένων CD34⁺ μονοπύρηνων κυττάρων μετά την πρώτη στήλη διαχωρισμού. **B)** Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. **Γ)** Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα όπου φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR) στα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και στα ισοτυπικά IgG2a-FITC και IgG2a-PE.



Εικόνα 4.8A, B, Γ: A) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ πληθυσμού μη επισημασμένων μονοπύρηνων κυττάρων μετά από τη χρήση της πρώτης στήλης διαχωρισμού. B) Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα όπου φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR) στα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και στα ισοτυπικά IgG2a-FITC και IgG2a-PE.



Εικόνα 4.9A, B, Γ: A) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ πληθυσμού των επισημασμένων CD34⁺ μονοπύρηνων κυττάρων μετά τη δεύτερη στήλη διαχωρισμού. **B)** Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. **Γ)** Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα όπου φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR) στα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και στα ισοτυπικά IgG2a-FITC και IgG2a-PE.



Εικόνα 4.10A, B, Γ: Α) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ πληθυσμού των μη επισημασμένων μονοπύρηνων κυττάρων μετά τη δεύτερη στήλη διαχωρισμού. B) Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα όπου φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR) στα CD34-FITC, CD45-PE, καθώς και στα ισοτυπικά IgG2a-FITC και IgG2a-PE.

Από την εικόνα 4.11Α, Β προκύπτει ότι περίπου το 90% του αριθμού των μονοπύρηνων κυττάρων μετά τη δεύτερη στήλη διαχωρισμού είναι θετικά στο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD34-FITC. Τέλος, αφού γίνει η απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων, ακολουθεί η καλλιέργειά τους για να γίνει η διαφοροποίησή τους σε OECs.



Εικόνα 4.11A, Β: Αντιπροσωπευτικές εικόνες που απεικονίζουν τα ποσοστά % Gated των μονοπύρηνων κυττάρων μετά τη δεύτερη στήλη διαχωρισμού που είναι θετικά στο A) ισοτυπικό control anti-IgG2a-FITC, B) και στο anti-CD34-FITC.

Καλλιέργεια των CD34⁺ κυττάρων και διαφοροποίηση τους προς προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- 1 Kit καλλιέργειας το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:
- Βασικό θρεπτικό μέσο των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell Basal Medium-2, EBM-2, 500 ml, Lonza)
- **2.** Ορός από έμβρυο βοδιού, (Foetal Bovine Serum, FBS, 10 ml, Lonza)
- **3.** Υδροκορτιζόνη (Hydrocortizone, 0.5 ml, Lonza)
- 4. Αυξητικός παράγοντας Β των ανθρώπινων ινοβλαστών (human Fibroblast Growth Factor-B, hFGF-B, 2 ml, Lonza)
- 5. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, 0.5 ml, Lonza)

- 6. Αυξητικός παράγοντας R3 που είναι παρόμοιος με την ινσουλίνη (R3 Insulin like growth factor, R3-IGF-1, 0.5ml, Lonza)
- **7.** Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, 0.5 ml, Lonza)
- 8. Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (hEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 9. Γενταμυκίνη, Αμφοτερικίνη Β (GA-1000, 0.5 ml, Lonza)
- **10.** Ηπαρίνη (Heparin, 0.5 ml, Lonza)
- Αποστειρωμένο διάλυμα Ficoll (Biocoll Separating Solution, 500 ml, Biochrom AG)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 και 50 ml (Corning)
- Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18 x 10 mm, Primaria Falcon)
- Αποστειρωμένα πλαστικά σιφώνια των 5, 10 και 25 ml (Costar, Corning Incorporated)
- Χρωστική Giemsa (Ferak Berlin)
- Ορός από έμβρυο βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Bovine Serum, FBS heat inactivated, Cibco BRL Life Technologies)
- Ανθρώπινη φιβρονεκτίνη (Human fibronectin, 1 mg, BD Biosciences)
- Θρυψίνη+EDTA (Trypsin+EDTA, Gibco BRL Life Technologies)
- Αποστειρωμένα κρυοφιαλίδια των 2 ml (cryovials, Greiner bio-one)
- DMSO (Dimethylsulfoxide for molecular biology, M.B. 78.13, Sigma)
- Κολλαγόνο (Collagen type I, Rat tail, 3.31 mg/ml, BD Biosciences)

Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα φιβρονεκτίνης 1mg/ml: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα PBS 1X: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα παγώματος: Σε ορό FBS προστίθεται κατάλληλος όγκος DMSO, ώστε να προκύψει διάλυμα FBS/5 ή 10% DMSO.
- Θρεπτικό μέσο EGM-2: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Διάλυμα κολλαγόνου 50 μg/ml: Το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα συγκέντρωσης
 3.31 mg/ml, αραιώνεται με διάλυμα CH₃COOH (0.02 N) μέχρι την συγκέντρωση των 50 μg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πριν από την έναρξη της καλλιέργειας των CD34⁺ κυττάρων, το πλακίδιο καλλιέργειας των 6 θέσεων καλύπτεται με διάλυμα φιβρονεκτίνης 9,9 μg/ml (2 ml στην κάθε θέση του πλακιδίου). Το πλακίδιο καλλιέργειας αφήνεται για 90-120 λεπτά στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα της φιβρονεκτίνης και οι επιφάνειες των πλακιδίων καλλιέργειας εκπλένονται 2 φορές με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS 1X. Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από φιβρονεκτίνη πλακίδιο καλλιέργειας το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργούνται για 20-30 μέρες παρουσία του θρεπτικού μέσου EGM-2, προκειμένου να γίνει η διαφοροποίησή τους σε OECs. Το θρεπτικό μέσο αλλάζεται κάθε 2-3 μέρες συνήθως ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Όταν τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν και καλύψουν σχεδόν πλήρως την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας (confluent), τότε έχουμε την 1^η γενιά ΟECs. Στη συνέχεια, μπορούν να πραγματοποιηθούν ανακαλλιέργειες των OECs, όπου ακολουθούνται διάφορες διαδικασίες, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

(A) Ψύξη κυττάρων (stock)

Για τη ψύξη των κυττάρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων (από φλάσκα ή τρυβλίο).
- 2 εκπλύσεις των κυττάρων με ποσότητα προθερμασμένου PBS 1X ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας.
- προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας και επώαση για ~1 λεπτό στους 37°C ή για ~2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ελέγχονται μέχρι να ξεκολλήσουν και προσέχουμε να μην αφήνεται η θρυψίνη παραπάνω από όσο χρειάζεται για να μην πεθάνουν τα κύτταρα).
- προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου (δεκαπλάσια ποσότητα από τον όγκο της τρυψίνης) για την εξουδετέρωση της δράσης της θρυψίνης από τον ορό.

- ανάμιξη και μεταφορά των κυττάρων σε ένα 15 ml σωληνάριο τύπου falcon όπου και αναδεύονται.
- φυγοκέντρηση κυττάρων στα 2000 rpm (626xg) για 5 λεπτά.
- ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα των κυττάρων 1 ml FBS/5 ή 10% DMSO και μεταφορά αυτών σε κατάλληλα κρυοφιαλίδια. Τα σωληνάρια τοποθετούνται αρχικά στους 4°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια στους -80°C, ώστε η ψύξη των κυττάρων να είναι σταδιακή. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υγρό άζωτο, αφού τοποθετηθούν αρχικά στους -80°C για 2-3 μέρες.

Οι αντίστοιχες ποσότητες των διαφόρων διαλυμάτων για κάθε πλακίδιο καλλιέργειας καταγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4.1:	Ποσότητες	του	διαλύματος	PBS	1X	ανάλογα	με	την	επιφάνεια	του	πλακιδίου
καλλιέργειας.											

Όγκος διαλύματος PBS 1X (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
5.0	φλάσκα (75 cm ²)
3.8	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.680	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm ²)

Πίνακας 4.2: Ποσότητες του διαλύματος θρυψίνης ανάλογα με την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας.

Όγκος διαλύματος θρυψίνης (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
1.3	φλάσκα (75 cm ²)
1.0	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.200	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm²)

Όγκος διαλύματος θρεπτικού μέσου (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
13.0	φλάσκα (75cm ²)
10.0	τρυβλίο (57 cm ²)
6*2.0	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm^2)

Πίνακας 4.3: Ποσότητες του διαλύματος θρεπτικού μέσου ανάλογα με την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας.

(B) Αραίωση κυττάρων (split)-απόκτηση νέας γενιάς

Από τη στιγμή που σχηματίστηκαν τα OECs κύτταρα (1η γενιά), στη συνέχεια οι ανακαλλιέργειες γίνονται χρησιμοποιώντας το κολλαγόνο. Τα OECs κύτταρα που σχηματίστηκαν μπορούν να αραιωθούν και να καλλιεργηθούν σε καινούργια πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων με σκοπό την απόκτηση καινούργιας γενιάς κυττάρων. Ανάλογα με το split που θα πραγματοποιηθεί διαφέρει το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα έτσι ώστε να γίνουν confluent. Συγκεκριμένα, μπορεί να ακολουθηθεί η παρακάτω διαδικασία

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας των πλακιδίων, τότε πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων με τον εξής τρόπο:

- αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και εκπλύσεις των κυττάρων με PBS 1X (2 φορές).
- προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης και επώαση για ~1 λεπτό στους 37°C
 ή για ~2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (τα ελέγχουμε μέχρι να ξεκολλήσουν και προσέχουμε να μην αφήσουμε τη θρυψίνη παραπάνω από όσο χρειάζεται για να μην πεθάνουν τα κύτταρα).
- προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου (δεκαπλάσια ποσότητα από τον όγκο της τρυψίνης) και καλή ανάδευση.
- ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε αναλογία 1:3-1:6 (δηλ. τα κύτταρα ενός πλακιδίου επανακαλλιεργούνται σε 3-6 πλακίδια).
- Αλλάζεται το θρεπτικό μέσο κάθε μία ως δύο μέρες ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

(Γ) Απόψυξη κυττάρων

Τα κρυοφιαλίδια των κυττάρων από τους -80°C ή από το υγρό άζωτο ξεπαγώνουν σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου. Λίγο πριν ξεπαγώσουν τελείως (ύπαρξη ενός μικρού κομματιού πάγου), τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει ποσότητα θρεπτικού μέσου ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα. Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από κολλαγόνο πλακίδιο καλλιέργειας (φλάσκα, τρυβλίο ή πλακάκι) το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του.

Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (HUVECs)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θρεπτικό μέσο Medium 199 1X (500 ml, Gibco BRL Life Technologies)
- Hank's balanced salt solution (HBSS, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Αντιβιοτικά Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη (10,000 Units/ml Penicillin/ 10,000 μg/ml Streptomycin, 100X, PAA)
- 5 g/φιαλίδιο Κολλαγονάση Τύπου Ι (Worthington Biochemical Corp. Freehold, NJ)
- Ορός από έμβρυο βοδιού (FBS, Gibco BRL Life Technologies)
- Ηπαρίνη (5.000 i.u./ml-5 ml, LEO)
- Αυξητικό συμπλήρωμα ενδοθηλιακών κυττάρων (ECGS, φιαλίδια των 15 mg, Sigma)
- Ορός από έμβρυο βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Bovine Serum, FBS heat inactivated, Gibco BRL Life Technologies)
- Θρυψίνη+EDTA (Trypsin+EDTA, Gibco BRL Life Technologies)
- Εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O, M.B.: 203,31 g/mol, Sigma)
- Ανθρώπινος ορός (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Immunotools)
- Ζελατίνη (Gelatin, Sigma)

- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα 250 U/mg κολλαγονάσης σε PBS: 0,1 g κολλαγενάσης διαλύονται σε 10 ml PBS που έχει θερμανθεί στους 37°C δίνοντας το stock διάλυμα. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο διήθησης 0.20 μ και διατηρείται στους -20°C. Η κολλαγενάση πριν χρησιμοποιηθεί θερμαίνεται στους 37°C για 1 ώρα.
- Διάλυμα 25 U/mg κολλαγονάσης σε PBS (διάλυμα εργασίας): Το διάλυμα αυτό προέρχεται από αραίωση 1:100 σε PBS του αρχικού διαλύματος 250 U/mg. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- Διάλυμα PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα κολλαγόνου 50 μg/ml: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Θρεπτικό μέσο Medium 199/ECGS (πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199/ECGS): Από το εμπορικά διαθέσιμο μέσο αφαιρούμε 26 ml και στη συνέχεια προσθέτουμε 120 ml FCS θερμικά απενεργοποιημένο, 300 μl ηπαρίνη, 6 ml διαλύματος Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (10,000 U/ml και 10,000 mg/ml) και 30 mg ECGS. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία ομφαλίου λώρου

Όλη η διαδικασία απομόνωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται υπό στείρες συνθήκες στο χώρο ιστοκαλλιεργειών, στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Ο χώρος καθαρίζεται με αιθανόλη (70%) πριν από τη χρήση του και ο λώρος παραλαμβάνεται με καθαρά αποστειρωμένα γάντια. Από τη στιγμή που παραλαμβάνεται ο ομφάλιος λώρος μπορεί να παραμείνει μέσα σε PBS 1X, το οποίο έχει αποστειρωθεί την προηγούμενη ημέρα σε βάζο, έως και 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

Απομόνωση HUVECs

Στον ομφάλιο λώρο υπάρχουν δυο αρτηρίες και μια μεγαλύτερη φλέβα από την οποία γίνεται η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο λώρος φέρει σημάδια από τους αιμοστάτες, τα οποία πρέπει να απομακουνθούν με κόψιμο 1-2 cm της περιογής από κάθε πλευρά, με αποστειρωμένο νυστέρι. Μετά την απομάκρυνση αυτών των σημείων, τοποθετούνται και στα δυο ανοίγματα της φλέβας οι αιμοστατικές λαβίδες (καθετήρες τριών δρόμων), οι οποίες σταθεροποιούνται με γειρουργικό νήμα. Η φλέβα ξεπλένεται με PBS 1X με τη βοήθεια σύριγγας και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι το διάλυμα να βγει καθαρό από τον λώρο. Κατά την έκπλυσή της, η φλέβα πρέπει να διογκώνεται. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια σύριγγας εισέρχεται διάλυμα κολλαγονάσης τόσο ώστε να γεμίσει η φλέβα και κλείνονται οι στρόφιγγες των καθετήρων τριών δρόμων. Ο ομφάλιος λώρος τοποθετείται σε προθερμασμένο PBS 1X, στους 37°C για 12 λεπτά ακριβώς. Μετά το τέλος της επώασης, ανοίγεται η μια στρόφιγγα και παραλαμβάνεται το διάλυμα κολλαγονάσης με το εναιώρημα των κυττάρων που βρίσκεται μέσα στο λώρο σε αποστειρωμένο κωνικό βαθμονομημένο σωλήνα των 50 ml. Από την άλλη πλευρά του καθετήρα εφαρμόζεται μια σύριγγα και ο λώρος εκπλένεται με PBS 1X και με πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199/ECGS έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της κολλαγονάσης. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm (160xg) για 10 λεπτά σε 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199/ECGS, ο όγκος του οποίου καθορίζεται από το μήκος του ομφάλιου λώρου, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.4: Ποσότητες του διαλύματος θρεπτικού μέσου ανάλογα με το μήκος του ομφάλιου λώρου και την αντίστοιχη επιφάνεια καλλιέργειας.

Μήκος ομφάλιου λώρου	Όγκος θρεπτικού μέσου	Φλάσκες καλλιέργειας
20 cm	5 ml	T25
80 cm	10 ml	T75

Τα κύτταρα είναι πλέον έτοιμα για καλλιέργεια, οπότε έχουμε HUVECs κύτταρα 1^{ης} γενιάς. Στη συνέχεια, μπορούν να γίνουν ανακαλλιέργειες όπως και στα OECs κύτταρα, όπου ακολουθούνται διάφορες διαδικασίες όπως η ψύξη, η αραίωση (split) και η απόψυξη των κυττάρων, όπως περιγράφηκαν προηγουμένως.

Καλλιέργεια των HUVECs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θρεπτικό μέσο Medium 199 1X (500 ml, Gibco BRL Life Technologies)
- Αντιβιοτικά Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη (10,000 Units/ml Penicillin/ 10,000 μg/ml Streptomycin, 100X, PAA)
- Κολλαγόνο (Collagen type I, Rat tail, 3.31 mg/ml, BD Biosciences)
- Ορός από έμβρυο βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS heat inactivated, Gibco BRL Life Technologies)
- Θρυψίνη+EDTA (Trypsin+EDTA, Gibco BRL Life Technologies)
- Ηπαρίνη (5.000 i.u./ml-5 ml, LEO)
- ECGS (φιαλίδια των 15 mg, Sigma)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH, 17.5M, Riedel-deHaën)
- DMSO (Dimethylsulfoxide for molecular biology, M.B. 78.13, Sigma)
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων (102 mm², Falcon, Becton Dickinson)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning Incorporated)

Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα κολλαγόνου 50 μg/ml: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα CH₃COOH 0.02 M: Ποσότητα διαλύματος CH₃COOH 17.5 M (stock διάλυμα) αραιώνεται σε αποστειρωμένο dH₂O προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 0.02 M. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα PBS 1X: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

- Θρεπτικό Medium 199/ECGS (πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199/ECGS): Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα παγώματος: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πριν από την έναρξη της καλλιέργειας των HUVECs τα πλακίδια καλλιέργειας (πλακάκια, τρυβλία, φλάσκες) καλύπτονται με διάλυμα κολλαγόνου 50 μg/ml. Το εκάστοτε πλακίδιο καλλιέργειας αφήνεται είτε για 20 λεπτά στον κλίβανο επώασης (5% CO₂) είτε για 1 ώρα στο θάλαμο νηματοειδούς ροής.

Οι αντίστοιχες ποσότητες για κάθε πλακίδιο καλλιέργειας καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.5:	Ποσότητες τ	ου διαλύματος	κολλαγόνου	ανάλογα	με την	επιφάνεια	του	πλακιδίου
καλλιέργειας (στο οποίο ανα	πτύσσονται τα	κύτταρα.					

Όγκος διαλύματος κολλαγόνου (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
4.6	φλάσκα (75 cm^2)
3.5	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.626	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm²)

Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα κολλαγόνου και οι επιφάνειες των πλακιδίων καλλιέργειας εκπλένονται 2 φορές με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS 1Χ. Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από μια φλάσκα ή τρυβλίο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία έχουν αναπτυχθεί ικανοποιητικά αλλά όχι σε σημείο που να κάνουν συσσωματώματα. Η μονοστιβάδα των κυττάρων εκπλένεται δύο φορές με PBS 1Χ στις ποσότητες έτσι όπως έχουν καταγραφεί στον πίνακα 4.1. Μετά την απομάκρυνση της ποσότητας του PBS 1Χ της τελευταίας έκπλυσης, στη μονοστιβάδα των κυττάρων προστίθεται ποσότητα θρυψίνης+EDTA η οποία αφήνεται για 20 δευτερόλεπτα με συνεχή ανακίνηση του εκάστοτε πλακιδίου καλλιέργειας ήπια και σταυρωτά. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η απομάκρυνση των

Υλικά - Μέθοδοι

νεκρών κυττάρων (κυττάρων που δεν έχουν κολλήσει ή έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας).

Μετά το πέρας των 20 δευτερολέπτων απομακρύνεται η θρυψίνη και προστίθεται εκ νέου ίση ποσότητα, όπως αναφέρεται στον πίνακα 4.2, ενώ το πλακίδιο καλλιέργειας ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό το ξεκόλλημα των κυττάρων. Τα κύτταρα μόλις αποκολληθούν παραλαμβάνονται και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει ποσότητα θρεπτικού μέσου ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα (Πίνακας 4.3).

Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από κολλαγόνο πλακίδιο καλλιέργειας το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του.

Διαίρεση κυττάρων-απόκτηση νέας γενιάς

Τα κύτταρα μπορούν να αραιωθούν (split) και να καλλιεργηθούν σε καινούργια πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων με σκοπό την απόκτηση καινούργιας γενιάς κυττάρων. Ανάλογα με το split που θα πραγματοποιηθεί διαφέρει το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα έτσι ώστε να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια του εκάστοτε πλακιδίου καλλιέργειας (confluent). Το θρεπτικό μέσο αλλάζεται ανά μία-δύο μέρες ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μέρες καλλιέργειας που απαιτούνται για να χαρακτηριστεί μια καλλιέργεια κυττάρων confluent ανάλογα με το split που θα πραγματοποιηθεί (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6: Οι μέρες καλλιέργειας των κυττάρων που απαιτούνται προκειμένου να γίνει μια καλλιέργεια confluent ανάλογα με το split που πραγματοποιείται κάθε φορά.

Split	Καλλιέργειες κυττάρων (confluent)
1:3	~ 2 μέρες
1:4	~ 2-3 μέρες
1:5	~ 4-5 μέρες
1:6	~ 5-6 μέρες

120

Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των EPCs, των CD34⁺ και των HUVECs κυττάρων

α) Με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Στην περίπτωση των CFU-Hill και CACs κυττάρων, τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι: 1ον το CD31-PE που αναγνωρίζει την έκφραση της πρωτεΐνης PECAM-1, 2ον το CD34-FITC που αναγνωρίζει τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, 3ον το CD45-FITC που ταυτοποιεί τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων, 4ον το CD14-FITC που είναι δείκτης των μονοκυττάρων, 5ον το KDR-PE που αναγνωρίζει τα κύτταρα με ενδοθηλιακό φαινότυπο, 6ον το CD133-PE που είναι δείκτης πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων και 7ον το CD61-FITC που αναγνωρίζει την $β_3$ υπομονάδα του υποδοχέα $α_{IIb}β_3$, ανεξάρτητα αν είναι ενεργοποιημένη ή όχι η ιντεγκρίνη. Στην περίπτωση των OECs χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD34-FITC, CD133-PE, CD45-FITC, CD14-FITC, KDR-PE και τέλος το CD31-PE. Στα CD34⁺ κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD34-FITC, κυ αναγνωρίζει την έκφραση της Ρ-σελεκτίνης. Τέλος, τα HUVECs κύτταρα εξετάστηκαν ως προς την έκφρασή τους στα αντιγόνα CD34, KDR, CD45, CD31 και CD133. Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιούνται και τα αντίστοιχα ισοτυπικά control IgG2a-FITC και IgG2a-PE.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)
- Λογισμικό Cell Quest (Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5ml (12x75mm, Becton Dickinson)
- BD FACSFlow, BD Biosciences
- IgG2a-FITC (Becton Dickinson)
- IgG2a-PE (Becton Dickinson)
- CD133-PE (Becton Dickinson)

- CD61-FITC (Becton Dickinson)
- CD31-PE (Becton Dickinson)
- CD34-FITC (Becton Dickinson)
- CD45-FITC (Becton Dickinson)
- KDR-PE (R and D Systems)
- CD14-FITC (Becton Dickinson)
- PAC-1-FITC (Becton Dickinson)
- CD62P-PE (Becton Dickinson)
- Θρυψίνη+EDTA (Trypsin+EDTA, Gibco BRL Life Technologies)
- Medium 199 (Gibco BRL Life Technologies)
- Ορός από έμβρυο μόσχου, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Calf Serum, FCS heat inactivated, Gibco BRL Life Technologies)

Διαλύματα εργασίας

- Θρεπτικό μέσο Medium 199/ 10% FCS: Σε 9 ml του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος θρεπτικού μέσου Medium 199 προστίθενται 1 ml FCS. Η ανάμιξη γίνεται υπό στείρες συνθήκες και το τελικό διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση. Τέλος, φυλάσσεται στο ψυχρό θάλαμο στους 4°C και μπορεί να διατηρηθεί για 1 μήνα.
- Θρεπτικό μέσο Medium 199/ 5% FCS. Σε 9,5 ml Medium 199 1Χ προστίθενται 0,5 ml FCS. Η ανάμιξη γίνεται υπό στείρες συνθήκες και το τελικό διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση. Τέλος, φυλάσσεται στο ψυχρό θάλαμο στους 4°C και μπορεί να διατηρηθεί για 1 μήνα.
- Διάλυμα PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα PBS 1X/ 5 mM EDTA. 2,33 ml EDTA 100X διαλύονται σε 22,69 ml PBS 1X μέχρι τελικού όγκου 25,02 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία

Στην περίπτωση των CFU-Hill κυττάρων, ο κυτταρομετρικός χαρακτηρισμός πραγματοποιείται την 9^η μέρα καλλιέργειας, ενώ αντίθετα τα CACs χαρακτηρίζονται Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

κυτταρομετρικά την 6^η-7^η μέρα. Τόσο τα OECs όσο και τα HUVECs κύτταρα καλλιεργούνται και αφού γίνουν confluent, πραγματοποιείται η διαδικασία του κυτταρομετρικού χαρακτηρισμού των κυττάρων. Τέλος, τα CD34⁺ κύτταρα μπορούν μετά την απομόνωσή τους να τοποθετηθούν άμεσα στο θρεπτικό τους μέσο στους 4°C για 1 μέρα και στη συνέχεια να γίνει κυτταρομετρικός χαρακτηρισμός τους. Ένας άλλος τρόπος είναι να γίνει αποκόλληση των CD34⁺ κυττάρων μετά από 1 μέρα καλλιέργειας.

Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνονται 3 διαδοχικές εκπλύσεις με PBS 1Χ. Προστίθενται 0,5 ml PBS/5 mM EDTA στην κάθε θέση του πλακιδίου των 24 θέσεων για τα CFU-Hill, ενώ 1-1,5 ml PBS/5 mM EDTA στην περίπτωση των CACs και των CD34⁺ κυττάρων όπου έχουμε πλακίδιο 6 θέσεων, αναδεύονται σταυρωτά και τοποθετούνται στους 37°C για 5 min. Παρατηρούνται στο μικροσκόπιο τα κύτταρα αν έχουν ξεκολλήσει, διαφορετικά τοποθετούνται ξανά στον κλίβανο επώασης στους 37°C. Αντίθετα, στην περίπτωση των OECs και των HUVECs κυττάρων προστίθενται 1-1,5 ml θρυψίνης-EDTA στην κάθε θέση του πλακιδίου των 6-well, αναδεύονται σταυρωτά και τοποθετούνται στους 37°C για 1-2 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, παρατηρούνται στο μικροσκόπιο τα κύτταρα αν έχουν ξεκολλήσει, διαφορετικά επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία. Αφού έχουν ξεκολλήσει όλοι οι τύποι κυττάρων, τοποθετούνται σε κωνικό σωλήνα των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 1000rpm (160xg) για 10 min (κύτταρα με EDTA), ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια Pasteur και αναδιασπείρονται τα κύτταρα στο σωλήνα σε 200 μl Medium 199/ 10% FBS.

Στη συνέχεια, μέσα στα αναδιεσπαρμένα κύτταρα (συγκέντρωσης 1,0-1,5 x 10^5 κύτταρα/ml) στα διάφορα σωληνάκια τοποθετούνται 10 μl από τα διάφορα αντισώματα και γίνεται επώαση στους 4°C για 30 min. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm (626xg) για 10 min, απομακρύνεται το υπερκείμενο και αναδιασπείρονται (εκπλένονται για την απομάκρυνση της περίσσειας των αντισωμάτων) σε 200 μl κρύου Medium 199/ 10% FBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 rpm (626xg) για 10 min, απομακρύνεται το υπερκείμενο ται με 200μl κρύου Medium 199/ 10% FBS. Γίνεται άλλη μια φυγοκέντρηση στις 2000 rpm (626xg) για 10 min. Μετά την έκπλυση και την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl κρύου Medium 199/ 5% FBS και τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος πραγματοποιείται με χαμηλή ροή (12μl ±

123

Υλικά - Μέθοδοι

3µl/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση των δεδομένων μέσω του λογισμικού Cell Quest του κυτταρομέτρου.

β) Με φθοριστικό μικροσκόπιο και μικροσκοπία συνεστιασμού

Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός, καθώς και μια ειδική κατηγορία του, ο ανοσοφθορισμός αποτελούν δύο από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές μελέτης τόσο ζωντανών, όσο και μονιμοποιημένων συστημάτων (καλλιεργειών κυττάρων). Ο ανοσοφθορισμός είναι η τεχνική φθορισμού που στηρίζεται στη σήμανση αντισωμάτων ή αντιγόνων με φθορίζουσες ενώσεις και χρησιμοποιείται συνήθως για την παρατήρηση της υποκυττάριας κατανομής διάφορων βιομορίων. Τα τμήματα ιστών ή κυτταροκαλλιεργειών μελετώνται μέσω της χρήσης μικροσκοπίου φθορισμού ή μικροσκοπίου συνεστιασμού. Η χρώση των κυττάρων κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα στάδια: προετοιμασία των κυττάρων, μονιμοποίηση, εφαρμογή του αντισώματος και αξιολόγηση.

Στο πρώτο στάδιο, γίνεται ακινητοποίηση των κυττάρων που πρόκειται να σημανθούν πάνω σε μια στερεή επιφάνεια για να είναι πιο εύκολος ο χειρισμός τους στις διαδικασίες που θα ακολουθήσουν. Τα προσκολλημένα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες ή και σε πλαστικές επιφάνειες παρόμοιας μορφολογίας. Το δεύτερο στάδιο είναι η μονιμοποίηση και η διαπερατότητα των μεμβρανών τους ώστε να είναι εφικτή η πρόσβαση του αντιγόνου στο αντίσωμά του. Η μονιμοποίηση ακινητοποιεί τα αντισώματα, ενώ παράλληλα διατηρείται η αυθεντική κυτταρική και υποκυττάρια αρχιτεκτονική, επιτρέποντας την πρόσβαση των αντισωμάτων σε όλα τα κύτταρα και τα υποκυττάρια συστατικά τους. Αξίζει να αναφερθεί ότι, υπάρχουν πολλά μέσα μονιμοποίησης. Η σωστή επιλογή εξαρτάται από τη φύση του αντιγόνου που μελετάται και από τις ιδιότητες του αντισώματος που χρησιμοποιείται. Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται είτε με οργανικά διαλύματα είτε με διαλύματα διασταυρωτής σύνδεσης. Οι οργανικοί διαλύτες, όπως οι αλκοόλες και η ακετόνη απομακρύνουν τα λιπίδια, αφυδατώνουν τα κύτταρα και καθιζάνουν τις πρωτεΐνες της κυτταρικής αρχιτεκτονικής. Τα διαλύματα διασταυρωτής σύνδεσης, όπως η παραφορμαλδεΰδη δημιουργούν

124
ομοιοπολικές ενδομοριακές γέφυρες μέσω των ελεύθερων αμινομάδων, δημιουργώντας έτσι ένα δίκτυο ομοιοπολικά προσδεδεμένων αντιγόνων. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με το αντίσωμα. Το μη προσδεμένο αντίσωμα απομακρύνεται με εκπλύσεις, ενώ το προσδεδεμένο αντίσωμα προσδιορίζεται είτε άμεσα (αν είναι επισημασμένο το πρώτο αντίσωμα), είτε έμμεσα χρησιμοποιώντας επισημασμένο με φθορίζουσα ένωση δευτερεύων αντίσωμα. Στο τέταρτο και τελευταίο βήμα, η χρώση αξιολογείται μέσω της παρατήρησης με μικροσκόπιο φθορισμού ή συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12: Διάταξη συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscope).

Η τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) χρησιμοποιείται για την αύξηση του βαθμού διαφοράς φωτεινού-σκούρου μιας εικόνας κατά την επεξεργασία ενός βιολογικού δείγματος. Είναι μια τεχνική απεικόνισης που ουσιαστικά αξιοποιείται για την αύξηση της αντίθεσης των μικρογραφιών και για την αναπαράσταση τρισδιάστατων εικόνων. Πρωτοπόρος του μικροσκοπίου συνεστιασμού ήταν ο Marvin Minsky το 1955 στο πανεπιστήμιο του Harvard, το οποίο στη συνέχεια εξελίχθηκε από τους Vivek Kumar και Rohini Mehta το 1957.

Στη μικροσκοπία συνεστιασμού, οι φακοί του μικροσκοπίου εστιάζουν το λέιζερ στο δείγμα σημείο προς σημείο γνωστό και ως εστιακό σημείο (focal point). Το λέιζερ σαρώνει το δείγμα και έτσι συλλέγονται πληροφορίες για αυτό. Τα δεδομένα αυτά αποτελούνται τόσο από φως της φθορίζουσας χρωστικής που χρησιμοποιείται όσο και από φως που αντανακλάται από το ίδιο το δείγμα. Στη συνέχεια το φως που εκπέμπει το εστιακό σημείο εστιάζεται σε ένα δεύτερο σημείο γνωστό ως σημείο συνεστιασμού (Confocal point). Στο σημείο αυτό υπάρχει ένα μικρό άνοιγμα (pinhole aperture) που επιτρέπει στο φως να περνά προς τον ανιχνευτή. Αντίθετα, πληροφορίες εκτός του εστιακού σημείου δεν καταγράφονται από τον ανιχνευτή [427, 428].

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Leica TCS SP5 ΙΙ συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe
- Λογισμικό Las AF Lite
- Leica DM IRBE μικροσκόπιο φθορισμού
- Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18 x 10 mm, Primaria Falcon BD)
- Λεκτίνη (Lectin, Ulex europaeus agglutinin I, FITC conjugate, 1 mg, Sigma)
- Διϊδιωμένη ακετυλιωμένη LDL (DiI-ac-LDL, 200 μg/ml, Biomedical Technologies)
- Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes)
- Αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες (coverslips)
- Παραφορμαλδεύδη (PFA, M.B.:30,03, Riedel de Haen, Sigma)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ (Nuaire)
- Θρεπτικό μέσο Medium 199 1X (500 ml, Gibco BRL Life Technologies)
- Ορός από έμβρυο μόσχου, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Calf Serum, FCS heat inactivated, Cibco BRL Life Technologies)
- Αντιβιοτικά Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη (10,000 Units/ml Penicillin/ 10,000 μg/ml Streptomycin 100X, PAA)
- Πρωτογενές αντίσωμα anti vWF (DakoCytomation)
- Δευτερογενές αντίσωμα anti Rabbit-Alexa488 (Invitrogen)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Γυάλινες καλυπτρίδες (coverslips)
- 1 Kit καλλιέργειας το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:

- Βασικό θρεπτικό μέσο των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell Basal Medium-2, EBM-2, 500 ml, Lonza)
- 2. Ορός από έμβρυο βοδιού, (Foetal Bovine Serum, FBS, 10 ml, Lonza)
- **3.** Υδροκορτιζόνη (Hydrocortizone, 0.5 ml, Lonza)
- 4. Αυξητικός παράγοντας Β των ανθρώπινων ινοβλαστών (human Fibroblast Growth Factor-B, hFGF-B, 2 ml, Lonza)
- 5. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 6. Αυξητικός παράγοντας R3 που είναι παρόμοιος με την ινσουλίνη (R3 Insulin like growth factor, R3-IGF-1, 0.5ml, Lonza)
- 7. Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, 0.5 ml, Lonza)
- 8. Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (hEGF, 0.5 ml, Lonza)
- 9. Γενταμυκίνη, Αμφοτερικίνη Β (GA-1000, 0.5 ml, Lonza)
- **10.** Ηπαρίνη (Heparin, 0.5 ml, Lonza)

Διαλύματα Εργασίας

- Διάλυμα θρεπτικού μέσου EGM-2. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου Medium199 (Medium 199/ 20% FCS/ 1% Pen./Str). Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται προηγουμένως.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4). Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα λεκτίνης 1 mg/ml. Η λεκτίνη (1 mg) διαλύεται σε 1 ml 0.9% NaCl (φυσιολογικό ορό) δίνοντας ένα καθαρό, κίτρινο διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- Διάλυμα λεκτίνης 10 μg/ml. Το αρχικό διάλυμα της λεκτίνης είναι 1 mg/ml και προστίθεται κατάλληλος όγκος φυσιολογικού ορού, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 μg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- Διάλυμα Dil-ac-LDL 10 μg/ml. Το αρχικό διάλυμα της Dil-ac-LDL είναι 200 μg/ml και προστίθεται κατάλληλος όγκος θρεπτικού μέσου (Medium 199/ 20% FCS/ 1% Pen./Str. ή EGM-2), ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 μg/ml.

- Διάλυμα Triton 0.1%. Παίρνεται διάλυμα Triton 20% και γίνεται αραίωση με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X δίνοντας διάλυμα Triton συγκέντρωσης 0.1%. Το διάλυμα διατηρείται σε
- Διάλυμα NH₄Cl 0.05M. Παρασκευάζεται διάλυμα NH₄Cl 0.5M, το οποίο αραιώνεται στη συνέχεια με κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS 1X δίνοντας διάλυμα NH₄Cl συγκέντρωσης 0.05M. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται προηγουμένως.
- Διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3.7% PFA/PBS. Θερμαίνονται 1.6 L PBS 1X (χωρίς ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου) στους 80°C και προστίθενται 74 g παραφορμαλδεΰδης, ενώ παράλληλα το διάλυμα αναδεύεται. Προστίθενται 200 μl διαλύματος 1 M CaCl₂ και 200 μl 1 M MgCl₂ σε συνολικό όγκο 2 L, ενώ γίνεται η ανάδευση του θερμού διαλύματος προκειμένου να παρεμποδιστεί η καταβύθιση. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει, προστίθεται PBS 1X μέχρι τα 2 L και ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα διατηρείται σε aliquots στους -20°C. Σε κάθε πείραμα ξεπαγώνονται όσα aliquot χρειάζονται και χρησιμοποιούνται άμεσα χωρίς να καταψύχονται ξανά.
- Διάλυμα blocking PBS-10%FCS. Παίρνονται 1 ml FCS και προστίθενται επιπλέον 9 ml PBS 1X, δίνοντας διάλυμα PBS-10%FCS. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C. Μετά την απόψυξη, μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για 1 μήνα.
- Αραιωμένο διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος avwF (R). 1 μl του αντισώματος αραιώνεται με 199 μl PBS-10%FCS (αραίωση 1:200). Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- Αραιωμένο διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος antiR-488. 1 μl του αντισώματος αραιώνεται με 299 μl PBS-10%FCS (αραίωση 1:300). Επιπλέον, στο αντίσωμα πρέπει να γίνει έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 2 min πριν γίνει η αραίωση. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη του συνεντοπισμού των πρωτεϊνών έλαβαν χώρα πειράματα ανοσοφθορισμού. Ειδικότερα, τα κύτταρα (CFU-Hill, CACs, OECs και HUVECs)

καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας 24 θέσεων. Η διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας όλων των κυττάρων περιγράφεται αναλυτικά προηγουμένως. Μετά την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των διαφόρων τύπων των κυττάρων, ακολουθεί η πειραματική διαδικασία με την οποία θα γίνει η ταυτοποίησή τους με το φθοριστικό μικροσκόπιο και τη μικροσκοπία συνεστιασμού. Σε αυτή την πειραματική πορεία, χρησιμοποιείται διάλυμα παραφορμαλδεύδης για να επιτευχθεί η σταθεροποίηση/μονιμοποίηση των κυττάρων επειδή με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες διατηρούν την ιδιότητά τους να φθορίζουν. Στη συνέχεια, το χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση της διαλύματος παραφορμαλδεύδης. Το απορρυπαντικό Triton X περίσσειας του χρησιμοποιείται γιατί είναι ένα μη ιοντικό επιφανειοδραστικό αντιδραστήριο, με το οποίο διαρρηγνύονται οι κυτταρικές μεμβράνες (λύση των κυττάρων), ώστε να γίνουν διαπερατές (αύξηση διαπερατότητας της μεμβράνης) και να εισέλθουν τα αντισώματα στο εσωτερικό των κυττάρων. Από την άλλη, το αντιδραστήριο PBS-10% FCS χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων (διάλυμα blocking). Οι αναλύσεις των εικόνων έγιναν με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J και Photoshop (Adobe Systems Incorporated). Τέλος, τα κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν ταυτόχρονα χρώση στην DiI-ac-LDL και την FITC-λεκτίνη μπορούν να ταυτοποιηθούν ως EPCs.

i) Χρώση κυττάρων με DiI-ac-LDL και FITC-Lectin

- Αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων.
- Ακολουθεί η ανάπτυξη των κυττάρων όπως περιγράφεται προηγουμένως.
- Την τελευταία μέρα καλλιέργειας γίνεται απομάκρυνση του υπερκειμένου από τα well.
- Ακολουθεί 2 φορές έκπλυση των well με PBS 1X.
- Προστίθενται στο κάθε well 0.5 ml διαλύματος DiI-ac-LDL τελικής συγκέντρωσης 10 μg/ml και επωάζονται για 4 ώρες στους 37°C. Στην περίπτωση των OECs και των HUVECs, όπου τα πειράματα πάντα διεξάγονται με μια γενιά μεγαλύτερη από αυτή που ξεπαγώνεται (confluent-split-ανακαλλιέργεια-confluent), η προσθήκη της

ακετυλιωμένης LDL πρέπει να γίνει τουλάχιστον 36 ώρες μετά τη χρήση της θρυψίνης.

- Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο που περιέχει την ακετυλιωμένη LDL.
- Εκπλένονται οι θέσεις των πλακιδίων με PBS 1X 3 φορές.
- Προστίθενται 400 μl διάλυμα 3.7% PFA/PBS σε κάθε well και επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η PFA πρέπει να είναι παγωμένη και να μην προστίθεται απευθείας πάνω στην καλυπτρίδα γιατί υπάρχει κίνδυνος να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων δεν είναι απαραίτητο να δουλέψουμε σε στείρες συνθήκες.
- Εκπλένονται τα well 3 φορές με PBS 1X.
- Προστίθενται 1 ml NH₄Cl 0.05M σε κάθε θέση και τα κύτταρα επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομακρύνεται το διάλυμα από τα well και προστίθενται 500 μl διαλύματος PBS 1X.
- Απομακρύνεται το PBS 1X και ακολουθεί η προσθήκη λεκτίνης (10 μg/ml) και γίνεται επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
- Απομακρύνεται το διάλυμα λεκτίνης από τα well και γίνεται έκπλυση με PBS 1X 3 φορές. Την τελευταία ποσότητα PBS 1X την αφήνουμε για να μη στεγνώσουν οι καλυπτρίδες. Στη συνέχεια, οι γυάλινες καλυπτρίδες παίρνονται προσεκτικά με λαβίδα και αντιστρέφονται σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα όπου έχουν τοποθετηθεί 5 μl ουσίας Prolong. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται έτσι ώστε η πλευρά των κυττάρων να έχει επαφή με το Prolong. Μέχρι να βγάλουμε τις καλυπτρίδες, δεν αποχύνουμε το PBS.
- Στη συνέχεια, η πλάκα με τα κύτταρα επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Μετά τα 30 λεπτά, περνάμε τις καλυπτρίδες με βερνίκι για προστασία και σκεπάζεται προσεκτικά με αλουμινόχαρτο και διατηρείται στους 4°C μέχρι την παρατήρηση με το φθοριστικό μικροσκόπιο. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια κεδρέλαιου.
- Εναλλακτικά, τα κύτταρα με την αντικειμενοφόρο πλάκα μπορούν να επωαστούν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου overnight και στη συνέχεια να τοποθετηθούν στους 4°C μέχρι να γίνει η παρατήρηση με το μικροσκόπιο.

ii) Χρώση κυττάρων με vwF

- Αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων.
- Ακολουθεί η ανάπτυξη των κυττάρων όπως περιγράφεται προηγουμένως.
- Την τελευταία μέρα καλλιέργειας γίνεται απομάκρυνση του υπερκειμένου από τα well.
- Ακολουθεί 2 φορές έκπλυση με PBS 1X.
- Προστίθενται 400 μl διαλύματος 3.7% PFA/PBS σε κάθε θέση και επωάζονται τα κύτταρα για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εκπλένονται τα well 3 φορές με PBS 1X.
- Προστίθεται 1 ml NH₄Cl 50 mM σε κάθε θέση και επωάζονται τα κύτταρα για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του διαλύματος και προσθήκη 500 μl PBS 1X.
- Προστίθεται 1 ml 0.1% Triton/PBS σε κάθε θέση και επωάζονται τα κύτταρα για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του διαλύματος και 3 φορές έκπλυση των θέσεων με PBS 1X.
- Στη συνέχεια, με ειδική λαβίδα παίρνονται προσεκτικά οι καλυπτρίδες από τα πλακίδια των 24 θέσεων και τοποθετούνται πάνω σε 50 μl διαλύματος PBS-10% FCS, το οποίο βρίσκεται πάνω σε ένα κομμάτι παραφίλμ (με την πλευρά των κυττάρων από την πλευρά του διαλύματος). Το παραφίλμ τοποθετείται μέσα σε ένα μη αποστειρωμένο τρυβλίο Petri των 57 cm², στο οποίο εξασφαλίζεται υγρασία, βάζοντας ένα βρεγμένο χαρτί κάτω από το παραφίλμ. Γίνεται επώαση των κυττάρων με το διάλυμα blocking για 40 min 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια, χωρίς να γίνει καμία έκπλυση με PBS 1X, προστίθενται 50 μl (για κάθε καλυπτρίδα) από το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα anti vWF πάνω στο παραφίλμ, όπου τοποθετούνται οι καλυπτρίδες και επωάζονται τα κύτταρα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (ή 40 min εναλλακτικά).
- Παίρνονται με προσοχή οι καλυπτρίδες με λαβίδα και γίνεται με τον ίδιο τρόπο 3 φορές έκπλυση με 50 μl διαλύματος PBS 1X.
- Έπειτα, προστίθενται 50 μl (για κάθε καλυπτρίδα) από το δευτερογενές αντίσωμα anti rabbit-Alexa488, όπου επωάζονται τα κύτταρα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (ή 20 min εναλλακτικά).

- Παίρνονται με προσοχή οι καλυπτρίδες με λαβίδα και γίνονται με τον ίδιο τρόπο 3 φορές έκπλυση με 50 μl διαλύματος PBS 1X.
- Στην τρίτη έκπλυση, αφήνονται τα κύτταρα με το PBS για να μην στεγνώσουν οι καλυπτρίδες.
- Πάνω στη γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 5 μl Prolong και από πάνω τοποθετούνται με προσοχή οι καλυπτρίδες ανάποδα (με την πλευρά των κυττάρων από την πλευρά του Prolong).
- Η πλάκα με τα κύτταρα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και επωάζεται στους 37°C για 30 min και στη συνέχεια διατηρείται στους 4°C μέχρι να γίνει η παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Εναλλακτικά πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων στο σκοτάδι overnight και την επόμενη μέρα αποθήκευση στους 4°C.

Παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Δοκιμασίες συσσώρευσης αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκαν σε φυσιολογικά άτομα. Πολλά φάρμακα επιδρούν στη λειτουργία των αιμοπεταλίων γι' αυτό και οι δότες θα πρέπει να μην έχουν κάνει χρήση αυτών τις προηγούμενες 14 μέρες. Συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες όπως η ασπιρίνη, η κλοπιδογρέλη και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και αντι-ισταμινικά, μπορεί να επηρεάσουν τις συσσωρευτικές ικανότητες των αιμοπεταλίων.

Τα αιμοπετάλια κατά την έκπλυσή τους χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην ενεργοποιηθούν. Η αναδιασπορά του ιζήματος των αιμοπεταλίων μετά από κάθε πλύση πρέπει να γίνεται γρήγορα ώστε το ίζημα να μη μένει χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας έκπλυσης και πριν την έναρξη των πειραμάτων συσσώρευσης με τους διάφορους τύπους κυττάρων (CD34⁺, CFU-Hill, CACs, OECs, HUVECs), καθώς και με τα υπερκείμενά τους, μπορούμε να αφήσουμε το τελικό εναιώρημα για 10-15 min προκειμένου να «ηρεμήσουν» τα αιμοπετάλια. Μία ένδειξη της σωστής έκπλυσης είναι, όταν με ελαφριά ανακίνηση του δοκιμαστικού σωλήνα παρατηρηθεί ένα λευκό συννεφάκι στο τελικό εναιώρημα που αποτελεί ένδειξη της παρουσίας των αιμοπεταλίων. Η διαδικασία απομόνωσης των διαφόρων κατηγοριών

κυττάρων, καθώς και η μεθοδολογία συλλογής των υπερκειμένων τους έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Η απυράση είναι μία φωσφατάση (adenosine 5' - triphosphatase και adenosine 5 'diphosphatase) η οποία μετατρέπει το απελευθερωμένο από τα αιμοπετάλια ADP σε ανενεργό AMP [429, 430]. Η PGE₁ ενεργοποιεί την AC οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων του cAMP και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Απυράση (EC 3.6.1.5, Sigma)
- PGE_1 (Προσταγλανδίνη E_1 , Sigma)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B.: 238.31 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, M.B.: 58.44 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl, M.B.: 74.56 g/mol, Sigma)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃, M.B.: 84.01 g/mol, Fluka-Garanite)
- Εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O, M.B.: 203.31 g/mol, Sigma)
- Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH₂PO₄·H₂O, M.B.: 137.99 g/mol, Merck)
- D(+) Γλυκόζη [D(+) C₆H₁₂O₆, M.B.: 180.16 g/mol, Fluka]
- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B.: 192.13 g/mol, Merck)
- Ένυδρο κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇·H₂O, M.B.: 210 g/mol, Merck)
- Διένυδρο κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7·2H_2O$, M.B.: 294.1 g/mol, Merck)
- Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O, M.B.: 147 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂, M.B.: 110.99 g/mol, Merck)
- Οξαλικό αμμώνιο [(NH₄)₂C₂O₄H₂O, M.B.: 142.11 g/mol, Mallinckrodt]
- Φυσιολογικός ορός (0.9% NaCl)
- Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH)

Διαλύματα Εργασίας

Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD). Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Συγκεκριμένα 0,8 g κιτρικού οξέος, 2,2 g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D

(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα διατηρείται στους $4^{\rm o}C.$

- Διάλυμα απυράσης. Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 500 U απυράσης σε λυοφιλοποιημένη μορφή, τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml φυσιολογικό ορό δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 U/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους - 80°C σε κλάσματα των 500 μl.
- Διάλυμα προσταγλανδίνης E₁ (PGE₁). Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 5 mg PGE₁ σε λυοφιλοποιημένη μορφή, τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml αιθανόλης δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorf, τα οποία σφραγίζονται με παραφίλμ λόγω της πτητικής ιδιότητας της αιθανόλης και διατηρούνται στους -80°C σε κλάσματα των 20 μl.
- Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1% βάρος κατ' όγκο (w/v). 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλυτοποιείται σε 100 ml απεσταγμένο νερό (dH₂O). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων (pH 6.5) 10Χ. Το διάλυμα αυτό περιέχει: 6% w/v χλωριούχο vάτριο (NaCl), 0.373% w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 0.9% w/v γλυκόζη (C₆H₁₂O₆), 7.56% w/v ένυδρο κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇·H₂O), 0.294% w/v ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O) και 0.203% w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O). Οι ουσίες διαλύονται σε dH₂O. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραίωση του παραπάνω διαλύματος με dH₂O. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.5 με διάλυμα NaOH (αρχικό pH 1.16). Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C.

Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (pH 7.35) 10Χ. Το διάλυμα αυτό περιέχει: 8.18% w/v χλωριούχο νάτριο (NaCl), 0.22% w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 1.8% w/v γλυκόζη (C₆H₁₂O₆), 0.1% w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O), 2.38% w/v HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) και 0.42% w/v όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃). Οι ουσίες διαλύονται σε dH₂O. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραίωση του παραπάνω διαλύματος με dH₂O. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7.35 με διάλυμα NaOH (αρχικό pH 6.98). Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C.

Διάλυμα 1 M CaCl₂. 11.099 g CaCl₂ διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Η απομόνωση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας [431] και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

 Η συλλογή του περιφερικού φλεβικού αίματος πραγματοποιείται σε σωληνάκια πολυαιθυλενίου των 12 ml, στα οποία έχει προστεθεί το αντιπηκτικό διάλυμα ACD. Η αναλογία αίματος-ACD σε κάθε σωληνάκι είναι 9:1 v/v. Αφού γίνει η συλλογή του δείγματος, στη συνέχεια προστίθενται 10 μl απυράσης και 5 μl πυκνής PGE₁ σε τελικές συγκεντρώσεις 1 Unit/ml και 1 μM, αντίστοιχα.

2. Ζυγοσταθμίζεται το προς φυγοκέντρηση δείγμα.

Φυγοκεντρείται το δείγμα σε φυγόκεντρο πάγκου στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) (126xg) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Μεταφέρονται προσεκτικά τα 2/3 από το υπερκείμενο PRP (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια) σε άλλο σωλήνα πολυαιθυλενίου. Κατά τη μεταφορά προσέχουμε να μην γίνει ανάμιξη του PRP με το υποκείμενο στρώμα λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.

5. Μετριέται ο όγκος του PRP που έχει απομονωθεί και συμπληρώνεται ως τα 10 ml με διάλυμα έκπλυσης (1X, pH 6.5). Επίσης, προστίθεται στο διάλυμα 1.5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 5 μl αραιής PGE₁ (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούνται ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

6. Ζυγοσταθμίζεται ο προς φυγοκέντρηση σωλήνας.

7. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση του υπολειπόμενου πλάσματος μαζί με τα κύτταρα του αίματος στις 2500 rpm (975xg) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Ετοιμάζεται σωληνάκι πολυαιθυλενίου με 10 ml διαλύματος έκπλυσης (1X, pH 6.5) (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος), στο οποίο έχουμε προσθέσει 1.5

μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 5 μl αραιής PGE_1 (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούνται ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

9. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 mL με το διάλυμα του βήματος 8. Ανακινούνται ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

10. Ζυγοσταθμίζεται ο προς φυγοκέντρηση σωλήνας.

 Ο σωλήνας φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο πάγκου στις 2500 rpm (975xg) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

 12. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα.

13. Αναδιασπείρεται αμέσως και προσεκτικά το ίζημά μας με το διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων pH 7.35 (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος). Προστίθεται όγκος διαλύματος εναιώρησης περίπου ίσος με το 1/3 του όγκου του PRP του σωλήνα του βήματος 5. Ανακινούνται ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

14. Υπολογίζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο εναιώρημα. Συγκεκριμένα 10 μl εναιωρήματος αναδιασπείρονται σε 190 μl οξαλικού αμμωνίου (αραίωση 1:20). Το μείγμα ομογενοποιείται ήπια και 10 μl από το εναιώρημα τοποθετούνται και στις δύο υποδοχές του αιματοκυτομέτρου, πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί η καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 15 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει ένα κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για τη διατήρηση της υγρής ατμόσφαιρας στο εσωτερικό του τρυβλίου. Μετά το πέρας των 15 min γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο με την πλάκα Neubauer. Ισχύει:

Συγκέντρωση αιμοπεταλίων = [άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα/5] Χ 1000 (αιμοπετάλια/μl).

15. Προστίθεται στο διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων τόσος όγκος διαλύματος εναιώρησης 1X pH 7.35, ώστε η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσωρευομετρίας να ισούται με 250.000/μl. Ανακινούνται ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

16. Λίγο πριν αρχίσουν τα πειράματα συσσωρευομετρίας των αιμοπεταλίων σε συνδυασμό με τα κύτταρα και το υπερκείμενό τους, αφήνουμε το τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων σε ηρεμία για 10 με 15 λεπτά αφού προστεθεί πρώτα ο απαιτούμενος όγκο διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου, ώστε η τελική συγκέντρωση του στο διάλυμα να ισούται με 1 mM.

Μελέτη της επίδρασης των CD34⁺, των EPCs και των HUVECs κυττάρων, καθώς και των υπερκειμένων τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Η συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (LTA: Light Transmission Aggregometry), δηλαδή η μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, θεωρείται μια ευαίσθητη μέθοδος της λειτουργικής ικανότητας των απομονωμένων αιμοπεταλίων. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η οπτική πυκνότητα ενός εναιωρήματος σωματιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων και όχι από το μέγεθός τους. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί στην καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μία από αυτές, η οποία εφαρμόστηκε στα πειράματά μας, είναι η μέτρηση του φωτός που διέρχεται από το τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων (μέθοδος κατά Born) [432].

Η μέτρηση αυτή γίνεται με ειδικό όργανο, το οποίο ονομάζεται συσσωρευόμετρο (aggregometer) (Εικόνα 4.13). Το συσσωρευόμετρο είναι ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με δύο θέσεις δειγμάτων, την PRP (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια) και την PPP (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια). Στη συσσωρευομετρία, προσέχουμε η θερμοκρασία των δειγμάτων να είναι πάντα στους 37°C προσομοιάζοντας με αυτό τον τρόπο τις in vivo συνθήκες. Τα δείγματα αναδεύονται με ειδικό μαγνητάκι στις 1200 rpm, συνθήκη αναγκαία για την in vitro συσσώρευσή τους. Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός διέρχεται μέσα από τις δύο κυψελίδες, οι οποίες περιέχουν το προς μέτρηση δείγμα και το δείγμα αναφοράς. Φωτοδίοδοι σιλικόνης ανιχνεύουν το φως, το οποίο περνά μέσα από τις δυο κυψελίδες. Η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου γίνεται αυθαίρετα, όπου το φως που πέρασε από την κυψελίδα με το δείγμα μας στη θέση PRP (πριν την προσθήκη αγωνιστή) θεωρείται 0% διαπερατότητα ή 0% συσσώρευση, ενώ το

φως που πέρασε από την κυψελίδα με το δείγμα αναφοράς θεωρείται 100% διαπερατότητα ή 100% συσσώρευση.



Εικόνα 4.13. Διάταξη συσσωρευομέτρου.

Η ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων βασίζεται στις αλλαγές που υπάρχουν στην εκπομπή του φωτός. Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφεται φωτομετρικά και αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη.

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προσδιορίζεται παρουσία διαφόρων αγωνιστών (ADP, θρομβίνη, αραχιδονικό οξύ, κολλαγόνο, Trap-14, κτλ). Στη συνέχεια, η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο και μετά από αναμονή 1 min υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι προστίθεται σε αυτή η κατάλληλη ποσότητα του αγωνιστή. Αυτό γίνεται για να μπορέσει το δείγμα μας να αποκτήσει τη θερμοκρασία του οργάνου η οποία είναι 37°C.

Η προσθήκη ενός αγωνιστή στο δείγμα (PRP ή πλυμένα αιμοπετάλια) προκαλεί αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων, με συνέπεια τη μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός. Αρχικά, τα αιμοπετάλια μετά την προσθήκη του αγωνιστή υφίστανται αλλαγή του σχήματός τους. Το μέγεθός τους αυξάνεται επιτρέποντας σε λιγότερο φως να περάσει από την κυψελίδα, οπότε αυτό καταγράφεται στην καμπύλη συσσώρευσης ως ελαττωμένη διαπερατότητα του φωτός (μικρή ανερχόμενη καμπύλη). Στη συνέχεια, παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα (κατερχόμενη καμπύλη) που

οφείλεται στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους, τα οποία σχηματίζουν συσσωματώματα κατά την πρωτογενή συσσώρευση. Κατόπιν, τα αιμοπετάλια είτε επανέρχονται (αποσυσσώρευση), όπου εμφανίζεται ανερχόμενη καμπύλη και μείωση της διαπερατότητας, είτε ακολουθούν ένα σταθερό πλατό (ευθεία γραμμή, σταθερή διαπερατότητα), είτε περνούν ένα πλατό και προχωρούν στη δεύτερη φάση της συσσώρευσης ή δευτερογενή συσσώρευση (μη αντιστρεπτή συσσώρευση) που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη, επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας). Η καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται για 4-5 λεπτά.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θρομβίνη (Thrombin, 10 Units/ml, Chrono-Log)
- Πεπτίδιο-14 ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης (TRAP-14, 1 mg, Bachem)
- Κολλαγόνο (Collagen, 1 mg/ml, Chrono-Log)
- Θρεπτικό μέσο Medium 199/ 20% FBS/ 1% Pen./Str.
- Θρεπτικό μέσο EGM-2
- CD34⁺ κύτταρα
- Υπερκείμενο των CD34⁺ κυττάρων
- EPCs κύτταρα (CFU-Hill, CACs και OECs)
- Υπερκείμενα των EPCs κυττάρων
- Φυσιολογικός ορός (0.9% NaCl)
- Συσσωρευόμετρο (Aggregometer, model 700-4DR, Chrono-Log)
- Καταγραφικό (Aggrolink, Chrono-Log)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης (Chrono-Log)
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης (Chrono-Log)

Διαλύματα Εργασίας

 Διάλυμα 20 U/ml θρομβίνη. Η εμπορική συσκευασία περιέχει λυοφιλοποιημένη θρομβίνη από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο διαλυτοποιείται σε 0.5 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 25 μl.

- Διάλυμα κολλαγόνου, 1 mg/ml. 1 μl από το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα προστίθεται σε όγκο 500 μl αιμοπεταλίων, δίνοντας τελική συγκέντρωση 2 μg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Ισοτονικό διάλυμα γλυκόζης, pH 2.7. 5 g γλυκόζης διαλύονται σε 90 ml dH₂O (5% w/v). Κατόπιν, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 2.7 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα χρησιμοποιείται για την αραίωση του εμπορικά διαθέσιμου κολλαγόνου και διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα Trap14, 5.75mM. 1 mg ουσίας διαλύεται σε 100 μl φυσιολογικού ορού δίνοντας συγκέντρωση 5.75 mM (stock).

Πειραματική διαδικασία

Μελετάται η επίδραση των CFU-Hill και CACs κυττάρων (συγκέντρωσης 5 x 10^6 κύτταρα/ θέση πλακιδίου 6-well) και των υπερκειμένων τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας την τεχνική της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα CFU-Hill και τα CACs κύτταρα αποκολλήθηκαν με προσοχή από την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας χρησιμοποιώντας διάλυμα PBS/5mM EDTA. Η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν μέσα στην κυψελίδα στο συσσωρευόμετρο ήταν 5 x 10^6 κύτταρα/ml. Το υπερκείμενο των κυττάρων που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε επαφή με τα κύτταρα τις 2 τελευταίες μέρες καλλιέργειας και είναι συμπυκνωμένο (0,6-0,7 ml αντί για 1 ml στο 24well ή 1,4-1,5 ml αντί για 2 ml στο 6-well). Επιπλέον, έγινε συλλογή του συμπυκνωμένου υπερκειμένου θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, το οποίο προερχόταν από κύτταρα συγκέντρωσης 1,2 έως 1,6 x 10^6 κύτταρα/ml. Τέλος, το υπερκείμενο που παραλήφθηκε, φυγοκεντρήθηκε στα 626xg για 5-10 λεπτά Στη συνέχεια, παίρνεται μικρή ποσότητα σε eppendorf και φυγοκεντρείται ξανά στα 12,000g σε υπερφυγόκεντρο για να απομακρυνθούν τυχόν μεμβρανικά και κυτταρικά υπολείμματα.

Στην περίπτωση των OECs και HUVECs, η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιείται στην κυψελίδα είναι 0,2 x 10⁶ κύτταρα/ml. Επιπλέον, τόσο τα OECs όσο και τα HUVECs κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη/EDTA. Το υπερκείμενο των κυττάρων που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε επαφή με τα κύτταρα τις 2 τελευταίες μέρες καλλιέργειας και είναι συμπυκνωμένο (1,4-1,5 ml αντί για 2 ml στο 6-well). Σχετικά με το υπερκείμενο των OECs και HUVECs κυττάρων, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

αυτή των CFU-Hill και CACs. Κατόπιν, ακολούθησαν οι μετρήσεις σύμφωνα με την περιγραφή στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Στην περίπτωση των CD34⁺ κυττάρων, επειδή κατά την απομόνωσή τους είναι περιορισμένα σε αριθμό, δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν πειράματα συσσωρευομετρίας όπου απαιτείται συγκέντρωση κυττάρων 0.2 x 10⁶ κύτταρα/ml. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιούνται απομονώσεις CD34⁺ κυττάρων από δύο διαφορετικούς δότες την ίδια πειραματική μέρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αφού ήταν αναδιεσπαρμένα στο θρεπτικό τους μέσο, διατηρήθηκαν στους 4°C για 1/2-1 μέρα, χωρίς να τοποθετηθούν σε πλακίδια καλλιέργειας. Έτσι, την επόμενη μέρα έγινε επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ένας δεύτερος τρόπος είναι να τοποθετηθούν στο πλακίδιο καλλιέργειας 6-θέσεων προκειμένου να κολλήσουν. Μετά από 3-4 ώρες αναμονή, απομακρύνεται με προσοχή το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει πιθανώς CD45⁺ κύτταρα, τα οποία δεν προσκολλήθηκαν στη φιβρονεκτίνη που υπάρχει στο πλακίδιο. Υπάργει πιθανότητα τα συγκεκριμένα κύτταρα ως φλεγμονώδη που είναι, να προξενήσουν την αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων. Στη συνέχεια, γίνονται ήπιες εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X και ακολουθεί η προσθήκη νέας ποσότητας θρεπτικού μέσου ανάπτυξης. Μετά από 1-1^{1/2} μέρες καλλιέργειας των κυττάρων ακολουθήθηκε η διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων χρησιμοποιώντας το διάλυμα PBS/5mM EDTA με σκοπό να ερευνηθεί η επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Επίσης, έγινε συλλογή του υπερκειμένου, το οποίο επεξεργάζεται όπως περιγράφεται προηγουμένως και χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της επίδρασής του στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Η υπόλοιπη ποσότητα υπερκειμένου φυλάσσεται στους -80°C, όπου μπορεί να διατηρηθεί για 1-2 μέρες σε περίπτωση που γρειαστεί να γίνουν επαναληπτικά πειράματα. Το υπερκείμενο των κυττάρων που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε επαφή με τα κύτταρα τις 2 τελευταίες μέρες καλλιέργειας και είναι συμπυκνωμένο (1,4-1,5 ml αντί για 2 ml στο 6-well). Σχετικά με το υπερκείμενο των CD34⁺ κυττάρων, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με αυτή των CFU-Hill και CACs. Κατόπιν, ακολούθησαν οι μετρήσεις σύμφωνα με την περιγραφή στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Για τη διαπίστωση της βιολογικής δράσης των CD34⁺ και HUVECs κυττάρων και των διάφορων κατηγοριών των EPCs (CFU-Hill, CACs και OECs), καθώς και των υπερκειμένων τους με συσσωρευομετρία σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου ακολουθούνται τα εξής βήματα:

 Ανοίγεται το συσσωρευόμετρο μισή ώρα πριν την εξέταση των παραπάνω δειγμάτων για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.

 Ετοιμάζονται μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματά μας. Σε κάθε κυψελίδα τοποθετείται από ένα μαγνητάκι.

Ξ. Ετοιμάζεται ένα δείγμα από 500 μl τελικού διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων
1X, pH 7.35 και τοποθετείται στη θέση PPP του οργάνου. Το δείγμα αυτό δε φέρει μαγνητάκι και παραμένει στη θέση αυτή μέχρι να τελειώσει το πείραμα.

4. Ετοιμάζεται ένα δείγμα (resting), το οποίο περιέχει μόνο το τελικό εναιώρημα αιμοπεταλίων χωρίς να έχει προστεθεί αγωνιστής για να εξεταστεί αν τα αιμοπετάλια μας είναι ενεργοποιημένα ή όχι.

5. Εφόσον τα αιμοπετάλια δεν είναι ενεργοποιημένα («ήρεμα»), τότε ετοιμάζεται ένα δείγμα αναφοράς (δείγμα ελέγχου) το οποίο περιέχει το τελικό εναιώρημα αιμοπεταλίων παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των κυττάρων. Το θρεπτικό μέσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων συσσωρευομετρίας διατηρείται στους 4°C. Στην περίπτωση των CFU-Hill χρησιμοποιείται το πλήρες θρεπτικό μέσο Medium 199, στα CD34⁺, στα CACs και OECs το θρεπτικό μέσο EGM-2, ενώ στα HUVECs το θρεπτικό μέσο Medium199/ECGS. Το δείγμα τοποθετείται στη θέση του οργάνου, όπου έχει την ένδειξη PRP. Η προσθήκη του αγωνιστή γίνεται σε διάφορες χρονικές στιγμές (1, 3 και 6 λεπτά επώασης) μετά την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο. Ο τελικός όγκος στην κυψελίδα ισούται με 500 μl. Ως αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα 20 U/ml θρομβίνης, 0.575 mM Trap-14 και 1 mg/ml κολλαγόνο, ώστε η τελική συγκέντρωση τους μέσα στην κυψελίδα να είναι 0.1 U/ml, 10 μM και 2 μg/ml, αντίστοιχα. Σε όλα τα δείγματα, η προσθήκη του αγωνιστή γίνεται σε συνεχώς αναδευόμενο εναιώρημα αιμοπεταλίων στις 1200 rpm.

6. Παρατηρείται η συσσώρευση του δείγματος για 4-5 λεπτά.

7. Καταγράφεται και τυπώνεται η % συσσώρευση του δείγματος αναφοράς (δείγματος ελέγχου).

8. Στις κυψελίδες με τα πλυμένα αιμοπετάλια τοποθετούνται ποσότητες των δειγμάτων μας (κύτταρα και υπερκείμενα) σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να εξεταστεί η επίδρασή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων συσσωρευομετρίας, οι διάφοροι τύποι κυττάρων, τα οποία είναι αναδιεσπαρμένα στο θρεπτικό τους μέσο διατηρούνται στους 37°C, ενώ αντίθετα, τα υπερκείμενα στους 4°C.

9. Μετά από 1, 3 και 6 λεπτά επώασης των πλυμένων αιμοπεταλίων με τα κύτταρα, καθώς και με τα υπερκείμενά τους, προστίθενται οι διάφοροι αγωνιστές, έτσι ώστε να μελετηθεί η πιθανή βιολογική δράση.

10. Παρατηρείται η συσσώρευση του δείγματος για 4-5 λεπτά.

11. Καταγράφεται και τυπώνεται η % συσσώρευση του δείγματος.

12. Ξεπλένονται οι κυψελίδες αρχικά με νερό και απορρυπαντικό και κατόπιν με χρωμοθειϊκό οξύ και απεσταγμένο νερό.

13. Ξεπλένονται τα μαγνητάκια με απεσταγμένο νερό και αιθανόλη.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλούν τα κύτταρα καθώς και τα υπερκείμενά τους δίνεται από την σχέση:

% Αναστολή = (Δείγμα Ελέγχου – Δείγμα παρουσία κυττάρων ή υπερκειμένων/Δείγμα Ελέγχου) × 100

Παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B.: 192.13 g/mol, Merck)
- Ένυδρο κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇·H₂O, M.B.: 294.10 g/mol, Merck)
- D(+) Γλυκόζη [D(+) C₆H₁₂O₆, M.B.: 180.16 g/mol, Fluka]
- Οξαλικό αμμώνιο [(NH₄)₂C₂O₄·H₂O, M.B.: 142.11 g/mol, Mallinckrodt]

Διαλύματα Εργασίας

Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD). Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Συγκεκριμένα 0,8 g κιτρικού οξέος, 2,2 g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D

(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου. 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλυτοποιείται σε 100 ml απεσταγμένο νερό (dH₂O). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση της συσσωρευτικής απόκρισης των αιμοπεταλίων γίνεται χρησιμοποιώντας πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Συλλέγονται 10 mL περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκια πολυαιθυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v). Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στις 900 rpm (126xg) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου όπου και απομονώνονται τα 2/3 από το υπερκείμενο υγρό (PRP). Το πλάσμα που υπολείπεται μαζί με τα κύτταρα του αίματος φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 3,100 rpm (1500xg) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και απομονώνεται το υπερκείμενο υγρό που είναι το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP).

Η μέτρηση των αιμοπεταλίων του PRP γίνεται με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου. Συγκεκριμένα, μετρούνται 5 μετρίου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου. Γνωρίζοντας ότι καθένα από τα 5 τετράγωνα καταλαμβάνει όγκο 0.004mm³ μπορούμε με τον παρακάτω τύπο να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό αιμοπεταλίων του PRP ανά mm³ ή ανά μL:

$\frac{(M έση τιμή αιμοπεταλίων των 5 τετράγωνων) × 1 mm³ × 20}{0.004 mm³}$

Στη συνέχεια με βάση τον αριθμό που βρίσκεται, υπολογίζεται η ποσότητα του PPP με την οποία πρέπει να αραιωθεί το ομόλογο του PRP έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 250,000 αιμοπετάλια/mm³ ή 250,000 αιμοπετάλια/μL. Ο απαιτούμενος όγκος V_{PPP} που απαιτείται για την αραίωση, προκύπτει από την παρακάτω σχέση:

AA x $V_{PRP} = 250,000 \text{ x } V_{o\lambda \iota \kappa \dot{o}}$

όπου: AA ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά mm³ στο αρχικό PRP, V_{PRP} ο όγκος του PRP, V_{PPP} ο όγκος του PPP ανά μl και $V_{o\lambda\iota\kappa\delta}$ ο όγκος του PRP και του PPP.

Μελέτη της επίδρασης των CD34⁺ (κυττάρων), OECs και HUVECs (κυττάρων και υπερκειμένων τους) στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι: 1ον το CD62P-PE που αναγνωρίζει την έκφραση της P-σελεκτίνης, 2ον το CD31-PE, 3ον το PAC-1-FITC που αναγνωρίζει τον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, 4ον το CD61-PerCP, 5ον το CD34-FITC, και 6ον το KDR-PE.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Medium 199 (Gibco BRL Life Technologies)
- Ορός από έμβρυο μοσχαριού, θερμικά απενεργοποιημένος (Foetal Calf Serum, FCS heat inactivated, Gibco BRL Life Technologies)
- Κύτταρα (CD34⁺, OECs, HUVECs)
- Υπερκείμενα κυττάρων
- Anti-CD61-PerCP (BD Biosciences)
- Anti-CD31-PE (BD Biosciences)
- Anti-CD34-FITC (BD Biosciences)
- Anti-VEGFR2/KDR-PE (R and D Systems)
- Anti-CD62P-PE (BD Biosciences)
- Anti-PAC-1-FITC (BD Biosciences)
- Anti-IgG2a-FITC (BD Biosciences)
- Anti-IgG2a-PE (BD Biosciences)
- Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, 2.5 mg, Chrono-Log)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5 ml (12×75 mm, Becton Dickinson)

- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)

Διαλύματα Εργασίας

- Medium199/ 10% FCS: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Medium199/ 5% FCS: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.
- Διάλυμα 1 mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP): Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 50 μl.

Πειραματική διαδικασία

Ο τρόπος απομόνωσης του PRP που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα μας περιγράφηκε στην παράγραφο Παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP). Η διαδικασία απομόνωσης των CD34⁺, OECs και HUVECs κυττάρων, καθώς και η μεθοδολογία συλλογής των υπερκειμένων τους, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στο συγκεκριμένο πείραμα έχει περιγραφεί προηγουμένως. Στην περίπτωση των CD34⁺ κυττάρων χρησιμοποιείται ως θετικό control το αντίσωμα CD34-FITC, ενώ στην περίπτωση των OECs και των HUVECs χρησιμοποιείται το αντίσωμα CD31-PE. Στα πειράματα μας χρησιμοποιούνται μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους, μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους, καθώς και ενεργοποιημένα και μη ενεργοποιημένα κύτταρα (χωρίς τα υπερκείμενά τους) απουσία των αιμοπεταλίων.

Γενικά, σε κάθε σωληνάκι κυτταρομέτρου τοποθετούνται στα άκρα 5μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα διαφορετικού φθοριοχρώματος.

α) Στην περίπτωση των αιμοπεταλίων απουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους πραγματοποιείται η παρακάτω πορεία:

Κεφάλαιο 4

Υλικά - Μέθοδοι

Σε ένα eppendorf προστίθενται 85 μl PRP (συγκέντρωσης 250,000 αιμοπετάλια/μl) και 15 μl διαλύματος Medium 199/ 5% FCS (για το σωληνάκι με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια) και σε ένα άλλο 85 μl PRP, 10 μl Medium 199/ 5% FCS και τέλος 5 μl ADP ($C_{re\lambda}$ = 50 μM) (για το σωληνάκι με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια). Γίνεται μια ήπια ανάδευση με το χέρι και πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 5 min. Στη συνέχεια, παίρνονται 5 μl από το κάθε eppendorf και τοποθετούνται στο κέντρο από το κάθε σωληνάκι κυτταρομέτρου. Έπειτα, προστίθεται διάλυμα Medium 199/ 5% FCS μέχρι τον όγκο των 50 μl, γίνεται ήπια ανάδευση στον κυκλοαναδευτήρα σε χαμηλή ταχύτητα και ακολουθεί επώαση για 20 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθενται 450 μl διαλύματος Medium 199/ 5% FCS, ακολουθεί έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

β) Στην περίπτωση των αιμοπεταλίων είτε παρουσία των κυττάρων, είτε των υπερκειμένων τους, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

Σε ένα eppendorf προστίθενται 85 μl PRP, 5 μl διαλύματος Medium 199/ 5% FCS και 10 μl κύτταρα (συγκέντρωσης 1 x 10⁶ κύτταρα/ml) ή υπερκείμενο (για το σωληνάκι με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια) και σε ένα άλλο 85 μl PRP, 10 μl κύτταρα ή υπερκείμενο και τέλος 5 μl ADP (για το σωληνάκι με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια). Στη συνέχεια, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

γ) Τέλος, στην περίπτωση των κυττάρων απουσία των αιμοπεταλίων, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική πορεία:

Σε ένα eppendorf προστίθενται 90 μl Medium 199/ 5% FCS και 10 μl κύτταρα (για το σωληνάκι με τα μη ενεργοποιημένα κύτταρα), ενώ στο άλλο 85 μl Medium 199/ 5% FCS, 10 μl κύτταρα και τέλος 5 μl ADP (για το σωληνάκι με τα ενεργοποιημένα κύτταρα). Η πειραματική διαδικασία που εκτελείται στη συνέχεια είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Αρχικά, εξετάζεται η επίδραση των κυττάρων και των υπερκειμένων στα αιμοπετάλια που δεν είναι προσκολλημένα στο ενδοθήλιο («ελεύθερα αιμοπετάλια»), ενώ στη συνέχεια, η επίδραση μόνο των κυττάρων σε εκείνα τα αιμοπετάλια τα οποία είναι

προσκολλημένα ("προσκολλημένα αιμοπετάλια") είτε στα OECs, είτε στα CD34⁺, είτε στα HUVECs.

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων μας, στην περίπτωση της μελέτης των αιμοπεταλίων που δεν είναι προσκολλημένα στο ενδοθήλιο, υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) των αντισωμάτων PAC-1, CD62P, CD61 και CD31 τόσο στα μη ενεργοποιημένα, όσο και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους. Οι τιμές MFI που προκύπτουν από τα ισοτυπικά control αφαιρούνται κάθε φορά από τις τιμές MFI των αντισωμάτων μας. Αρχικά, υπολογίζεται το ποσοστό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων απουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους διαμέσου του ποσοστού αύξησης του MFI των αντισωμάτων PAC-1 και CD62P. Γενικά για τα αντισώματα PAC-1 και CD62P ισχύει:

Κατόπιν, υπολογίζεται το αντίστοιχο ποσοστό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων παρουσία των κυττάρων και των υπερκειμένων τους σύμφωνα με την παραπάνω σχέση. Επομένως, το ποσοστό αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είτε από τα κύτταρα είτε από τα υπερκείμενά τους υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

	Ποσοστό ενεργοποίησης αιμοπεταλίων - Ποσοστό ενεργοποίησης αιμοπεταλίων παρουσία κυττάρων ή υπερκειμένων	v 100
% Αναστολη=		- x 100

Δεύτερον, υπολογίζεται το ποσοστό (% Gated) των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία και απουσία των κυττάρων ή των υπερκειμένων τους που είναι διπλοθετικά για τα αντισώματα PAC-1 και CD61 (PAC-1⁺/CD61⁺) καθώς και για τα αντισώματα CD62P και CD61 (CD62P⁺/CD61⁺). Με αυτόν τον τρόπο, εξετάζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων (CD61⁺), τα οποία είναι παράλληλα ενεργοποιημένα (PAC-1⁺ και CD62P⁺). Στη συνέχεια, υπολογίζεται πάλι το ποσοστό αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τα κύτταρα και τα υπερκείμενά τους ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

Στην περίπτωση των προσκολλημένων αιμοπεταλίων στα κύτταρα, εξετάζεται η επίδραση μόνο των κυττάρων και όχι των υπερκειμένων τους στα αιμοπετάλια. Συγκεκριμένα, μελετάται το ποσοστό (% Gated) των αιμοπεταλίων και των κυττάρων που είναι διπλοθετικά για τα αντισώματα CD31 και CD61 (CD31⁺/CD61⁺). Στη συνέχεια, στην επιλεγμένη περιοχή υπολογίζονται οι λόγοι των MFI των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61, τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των κυττάρων. Στη συνέχεια, συγκρίνονται οι λόγοι που προκύπτουν ανάμεσα στα μη ενεργοποιημένα και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, καθώς και ανάμεσα στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS 20.0. Οι τιμές εκφράστηκαν ως η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD). Η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το Independent-Samples T-test και το Paired-Samples T-test. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως P<0.05.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

Αποτελέσματα

Α. Ανίχνευση των EPCs στο ολικό αίμα

Αρχικά, πριν από την έναρξη των πειραμάτων καλλιέργειας των κυττάρων τα οποία θα οδηγήσουν στη διαφοροποίηση προς EPCs, έπρεπε να εξετάσουμε ποιοι είναι πραγματικά οι κυτταρικοί πληθυσμοί που είναι περισσότερο εμπλουτισμένοι σε CD34⁺ καθώς και σε CD34⁺/KDR⁺. Οι συγκεκριμένοι πληθυσμοί κυττάρων οι οποίοι εκφράζουν αυτούς τους φαινοτύπους θα απομονωθούν και μετά από καλλιέργεια θα οδηγήσουν στη διαφοροποίηση προς EPCs. Επομένως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στο ολικό αίμα προκειμένου να εντοπιστούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί που παρουσιάζουν αρχικά μεγαλύτερη έκφραση CD34. Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο υποπληθυσμός των CD34⁺ κυττάρων που εκφράζουν παράλληλα και KDR, δηλαδή τα $CD34^+/KDR^+$ κύτταρα. Στην πειραματική διαδικασία, όπως αναφέρεται και στη Μεθοδολογία, χρησιμοποιήθηκαν το CD45 ως χαρακτηριστικός δείκτης των λευκοκυττάρων, το αντιγόνο CD34 για την ταυτοποίηση των πρόδρομων κυττάρων και τέλος το KDR που είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη ενδοθηλιακού φαινοτύπου. Με βάση το FSC και το SSC όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1A, στις περιοχές R1, R2 και R3 εντοπίζονται τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Το CD45 όπως είναι ήδη γνωστό, ανιγνεύτηκε στους τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 5.1B. Στη συνέχεια, θελήσαμε να ανιχνεύσουμε το CD34 στους συγκεκριμένους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων, όπως απεικονίζονται στην εικόνα 5.1Α. Προέκυψε ότι, το CD34 εντοπίζεται στις περιοχές R2 και R3, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1Γ. Συνεπώς, η περιοχή R4 των λεμφομονοκυττάρων ή MNCs, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.1 Δ είναι περισσότερο εμπλουτισμένη σε CD34⁺ κύτταρα. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η έκφραση του KDR στις περιοχές R2 και R3 όπου εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση του CD34, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1Ε. Συνολικά, διαπιστώνεται ότι, τα CD34 και KDR εκφράζονται στην περιοχή R4, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.1ΣΤ. Στη συνέχεια, θέλαμε να εξετάσουμε τους φαινότυπους CD34⁺/CD45⁺ και

CD34⁺/KDR⁺. Αρχικά, ανιχνεύθηκαν τα CD34⁺/CD45⁺ κύτταρα τα οποία είναι HPCs, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1Ζ. Τέλος, προσδιορίστηκαν τα CD34⁺/KDR⁺ κύτταρα τα οποία είναι σπάνια κύτταρα και εντοπίζονται σε μικρό ποσοστό στην κυκλοφορία, όπως φαίνεται και από την εικόνα 5.1Η. Τα κύτταρα με το συγκεκριμένο φαινότυπο παρουσιάζουν πρόδρομο χαρακτήρα καθώς και ενδοθηλιακά χαρακτηριστικά.





Εικόνα 5.1: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής ολικού αίματος, όπου με βάση το ιστόγραμμα FSC vs SSC εντοπίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί των ουδετερόφιλων (περιοχή R1), λεμφοκυττάρων (περιοχή R2) και μονοκυττάρων (περιοχή R3). Β) Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την έκφραση του CD45 στις περιοχές R1, R2 και R3. Γ) Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την έκφραση του CD34 στις περιοχές R1, R2 και R3. Δ) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής ολικού αίματος, όπου επιλέγεται ο πληθυσμός των MNCs (περιοχή R4). Ε) Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την έκφραση του CD34 στις περιοχές R1, R2 και R3. Δ) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής ολικού αίματος, όπου επιλέγεται ο πληθυσμός των MNCs (περιοχή R4). Ε) Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την έκφραση του KDR στις περιοχές R2 και R3. ΣΤ) Γραφήματα στηλών που δείχνουν την έκφραση των CD34 και KDR στην περιοχή R4. Ζ) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα όπου απεικονίζονται τα CD34⁺/CD45⁺ κύτταρα, τα οποία θεωρούνται ως HPCs. Η) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει τα CD34⁺/KDR⁺ κύτταρα τα οποία θεωρούνται ως κυκλοφορούντα EPCs.

Αποτελέσματα

Β. Χαρακτηρισμός των απομονωμένων κυτταρικών πληθυσμών EPCs

Στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες των τριών κατηγοριών των EPCs, CFU-Hill, CACs και OECs. Όπως φαίνεται από τη Μεθοδολογία, ο πληθυσμός των MNCs επιλέχθηκε για την καλλιέργεια και τη διαφοροποίησή του προς EPCs. Τα MNCs τα οποία απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα δηλαδή τα PB-MNCs καλλιεργήθηκαν υπό κατάλληλες συνθήκες και διαφοροποιήθηκαν προς CFU-Hill ή CACs κύτταρα, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη μεθοδολογία. Γνωρίζοντας ότι, το CB είναι πλούσια πηγή σε CD34⁺ κύτταρα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση CD34⁺ κυττάρων από τον πληθυσμό των MNCs τα οποία προέρχονταν από το CB, δηλαδή των CB-MNCs. Στη συνέχεια, τα CD34⁺ κύτταρα καλλιεργήθηκαν κάτω από κατάλληλες συνθήκες διαφοροποίησης και διαφοροποιήθηκαν προς OECs. Πρέπει να τονιστεί ότι, το κυτταρομετρικό προφίλ του ολικού αίματος από το CB δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές με το αντίστοιγο προφίλ από το PB. Μια σημαντική διαφορά που εμφανίζουν τα δύο προφίλ είναι ότι τα CD34⁺ κύτταρα εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην περιοχή των CB-MNCs. Για αυτό το λόγο, τα CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό από τον πληθυσμό των CB-MNCs. Επίσης, καλλιεργήθηκαν HUVECs τα οποία είναι ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου που έχουν απομονωθεί από τον CB. Μετά την πάροδο των αντίστοιχων ημερών καλλιέργειας για την κάθε κατηγορία των κυττάρων, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Μεθοδολογίες, ακολούθησε χαρακτηρισμός των κυττάρων με τους παρακάτω τρόπους:

 Με οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο με σκοπό να εξεταστεί η μορφολογία και το χαρακτηριστικό σχήμα των κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η ικανότητα σχηματισμού αποικιών καθώς επίσης και η τροποποίησή τους σε ενδοθηλιακού φαινοτύπου κύτταρα, όπου εμφανίζουν ατρακτοειδές και ελλειψοειδές σχήμα.

2) Με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής αφού αρχικά αποκολλήθηκαν προκειμένου να χαρακτηριστούν τα κύτταρα ως προς την έκφραση διαφόρων επιφανειακών κυτταρικών αντιγόνων.

3) Τέλος, με το φθοριστικό μικροσκόπιο και τη μικροσκοπία συνεστιασμού. Για την ταυτοποίηση των κυττάρων με τη μεθοδολογία της μικροσκοπίας συνεστιασμού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρωτεΐνες:

Αποτελέσματα

α) Ac-LDL

Η DiI-ac-LDL είναι ακετυλιωμένη LDL επισημασμένη με τη χρωστική 1,1'διοκταδέκυλ-3,3,3',3'-τετραμέθυλ-ινδοκαρβοκυάνινο υπερχλωρικό (DiI). Η συγκεκριμένη ένωση επισημαίνει τόσο τα αγγειακά ECs, όσο και τα μακροφάγα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθούν και να απομονωθούν αυτά τα κύτταρα από μεικτούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Όταν τα EPCs και τα HUVECs επωάζονται με DiI-ac-LDL, η λιποπρωτεΐνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα αυτά, αποικοδομείται από τα λυσοσωμικά ένζυμα και το φθοριόχρωμα DiI (κόκκινο χρώμα) συσσωρεύεται στις ενδοκυττάριες μεμβράνες. Έτσι, είναι σαφές ότι τα κύτταρα έχουν την ικανότητα πρόσληψης της DiI-ac-LDL μέσω ενδοκύτωσης.

β) Λεκτίνη

Η λεκτίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στις γλυκοπρωτεΐνες και να προσκολλάται σε κύτταρα. Στη μελέτη μας, τα κύτταρα δεσμεύουν τη λεκτίνη, η οποία είναι σημασμένη με το φθοριόχρωμα FITC (πράσινο χρώμα). Έτσι, με αυτόν τον τρόπο προέκυψαν χαρακτηριστικές εικόνες χρώσης όλων των τύπων των EPCs και των HUVECs με DiI-ac-LDL και FITC-λεκτίνη. Τέλος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image J, πραγματοποιείται η αλληλοεπικάλυψη των εικόνων οπότε προκύπτει το πορτοκαλί χρώμα για τα κύτταρα που εμφανίζουν ταυτόχρονα χρώση στην DiI-ac-LDL και την FITC-λεκτίνη.

γ) vWF

Όπως είναι γνωστό, ο vWF είναι μια μεγάλη πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος που εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμόστασης. Επιπλέον, ο vWF εκκρίνεται από τα ECs από τα σωματίδια Weibel Palade καθώς και από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Στη μελέτη μας, ο vWF επισημασμένος με το φθοριόχρωμα FITC χρησιμοποιήθηκε στα CACs, OECs και τέλος στα HUVECs κύτταρα.

1. Χαρακτηρισμός των CFU-Hill

Ι. Με ανάστροφο μικροσκόπιο

Μετά από τις καλλιέργειες των PB-MNCs, οδηγηθήκαμε στην ανάπτυξη των CFU-Hill, χαρακτηριστικές εικόνες των οποίων προέκυψαν χρησιμοποιώντας το ανάστροφο

μικροσκόπιο (Εικόνα 5.2A, B). Τα CFU-Hill κύτταρα έχουν την ικανότητα μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού. Στην εικόνα 5.2B παρατηρείται μια χαρακτηριστική αποικία CFU-Hill κυττάρων που αποτελείται από τον κεντρικό πυρήνα των σφαιρικών κυττάρων καθώς και επιμήκη κύτταρα στην περιφέρεια.



Εικόνα 5.2: Αντιπροσωπευτική εικόνα των CFU-Hill κυττάρων σε **A**) μεγέθυνση 10X και **B**) μεγέθυνση 40X, όπου διακρίνεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών.

ΙΙ. Με κυτταρομετρία ροής

Μετά από καλλιέργεια συνολικά εννιά ημερών των PB-MNCs και σχηματισμό των CFU-Hill, τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια του πλακιδίου με διάλυμα PBS/5mM EDTA και αναλύονται με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Στην εικόνα 5.3A απεικονίζεται ένα αντιπροσωπευτικό σχήμα κυτταρομετρίας ροής όπου στην περιοχή R1 εντοπίζεται ο πληθυσμός των CFU-Hill κυττάρων που έχουν αποκολληθεί.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.3B, τα CFU-Hill εκφράζουν κυρίως CD34 και CD133 που είναι δείκτες των πρόδρομων κυττάρων, CD45 που είναι ένα αντιγόνο εξειδικευμένο για τα αιμοποιητικά κύτταρα (λευκοκύτταρα), καθώς και CD14 που είναι δείκτης των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν σε σημαντικό βαθμό KDR που είναι δείκτης των ECs. Τέλος, τα CFU-Hill κύτταρα εκφράζουν δευτερευόντως CD31 που ταυτοποιεί ECs, αλλά και αιμοπετάλια και μακροφάγα, ενώ καθόλου την πρωτεΐνη CD61.





Εικόνα 5.3: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των CFU-Hill κυττάρων, τα οποία έχουν αποκολληθεί από το πλακίδιο καλλιέργειας. Β) Χαρακτηρισμός των CFU-Hill κυττάρων παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-KDR-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CD133-PE και anti-CD61-FITC.

ΙΙΙ. Με φθοριστικό μικροσκόπιο και μικροσκοπία συνεστιασμού

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με την DiI-ac-LDL και την FITC-λεκτίνη. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 5.4Α παρατηρείται η χρώση των κυττάρων με DiI-Ac-LDL με αποτέλεσμα την εμφάνιση κόκκινου χρώματος. Επιπλέον, στην εικόνα 5.4Β φαίνεται η χρώση των κυττάρων με την FITC-λεκτίνη, το οποίο διαπιστώνεται από την εμφάνιση πράσινου χρώματος. Τέλος, τα κύτταρα που εμφανίζουν φθορισμό τόσο για την DiI-ac-LDL όσο και για την FITC-λεκτίνη ταυτοποιούνται ως CFU-Hill (Εικόνα 5.4Γ).



Εικόνα 5.4: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CFU-Hill κυττάρων με DiI-ac-LDL. **B)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CFU-Hill κυττάρων με FITC-λεκτίνη. **Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CFU-Hill κυττάρων με DiI-ac-LDL και FITC-λεκτίνη.

2. Χαρακτηρισμός των CACs

Ι. Με ανάστροφο μικροσκόπιο

Μετά από τις καλλιέργειες των PB-MNCs, οδηγηθήκαμε στο σχηματισμό των CACs κυττάρων. Τα CACs κύτταρα είναι μονήρη και έχουν βασικά σφαιρικό σχήμα, ενώ παρατηρούνται και ορισμένα τα οποία είναι ατρακτοειδή. Σε αντίθεση με τα CFU-Hill, τα CACs δεν έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Αντιπροσωπευτική εικόνα των CACs κυττάρων όπου τα κύτταρα είναι μονήρη και έχουν κυρίως σφαιρικό σχήμα, ενώ υπάρχουν και ορισμένα τα οποία είναι ατρακτοειδή.

ΙΙ. Με κυτταρομετρία ροής

Παρομοίως με τα CFU-Hill κύτταρα, ακολουθήθηκε η διαδικασία καλλιέργειας των PB-MNCs προς CACs σύμφωνα με την παράγραφο Μεθοδολογίες και στη συνέχεια αποκολλήθηκαν προκειμένου να γίνει ανάλυση και χαρακτηρισμός τους στο κυτταρόμετρο. Στην εικόνα 5.6A απεικονίζεται ένα αντιπροσωπευτικό σχήμα κυτταρομετρίας ροής όπου στην περιοχή R1 εντοπίζεται ο πληθυσμός των CACs κυττάρων που έχουν αποκολληθεί από το πλακίδιο καλλιέργειας. Τα CACs εκφράζουν κυρίως τις πρωτεΐνες CD45, CD31, KDR και CD14 και δευτερευόντως τα αντιγόνα CD34, CD133 (Εικόνα 5.6B).




Εικόνα 5.6: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των CACs κυττάρων, τα οποία έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια καλλιέργειας. Β) Χαρακτηρισμός των CACs κυττάρων παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-KDR-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CD133-PE και anti-CD61-FITC.

ΙΙΙ. Με φθοριστικό μικροσκόπιο και μικροσκοπία συνεστιασμού

Στη συνέχεια, έγινε χρώση των κυττάρων με την DiI-ac-LDL και την FITCλεκτίνη. Στην εικόνα 5.7Α φαίνεται η χρώση των με την DiI-ac-LDL, όπου τα κύτταρα εμφάνισαν κόκκινο χρώμα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε χρώση με FITC-λεκτίνη με αποτέλεσμα την εμφάνιση πράσινου χρώματος (Εικόνα 5.7B). Επιπλέον, τα κύτταρα που παρουσιάζουν φθορισμό τόσο για την DiI-ac-LDL, όσο και για την FITC-λεκτίνη εμφανίζουν πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 5.7Γ). Τέλος, τα CACs χαρακτηρίστηκαν ως προς τη χρώση τους με τον vWF, όπου παρατηρήθηκε η εμφάνιση πράσινου χρώματος (Εικόνα 5.7Δ).





Εικόνα 5.7: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CACs κυττάρων με DiI-ac-LDL. **B)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CACs κυττάρων με FITC-λεκτίνη. **Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CACs κυττάρων με DiI-ac-LDL και λεκτίνη.



Εικόνα 5.7: Δ) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των CACs κυττάρων με vwF.

3. Χαρακτηρισμός των OECs

Ι. Με ανάστροφο μικροσκόπιο

Τα CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από τα CB-MNCs, τα οποία στη συνέχεια μετά από 30 μέρες καλλιέργειας διαφοροποιήθηκαν σε OECs. Τα OECs είναι κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των HUVECs ως προς το σχήμα, τη μορφολογία και την ικανότητα εξάπλωσής τους (Εικόνα 5.8).



Εικόνα 5.8: Αντιπροσωπευτική εικόνα των OECs κυττάρων, όπου τα κύτταρα έχουν μεγάλη ικανότητα εξάπλωσης και πολλαπλασιασμού, καθώς και παρόμοιο σχήμα με τα HUVECs.

ΙΙ. Με κυτταρομετρία ροής

Τα OECs κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία χαρακτηρισμού ήταν 1^{ης} και 4^{ης} ανακαλλιέργειας. Στην εικόνα 5.9Α φαίνεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των OECs κυττάρων που είναι παρόμοια με αυτή των HUVECs. Τα OECs 1^{ης} γενιάς εκφράζουν CD34, KDR, CD31 και σε μικρό ποσοστό CD133, ενώ αντίθετα διαπιστώνεται μηδενική έκφραση του αντιγόνου CD45 (Εικόνα 5.9B). Τα OECs 4^{ης} ανακαλλιέργειας εκφράζουν CD34, KDR, CD31, ενώ αντίθετα παρατηρείται ελάχιστη ή μηδαμινή έκφραση των αντιγόνων CD45 και CD133 (Εικόνα 5.9Γ). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση του CD14 στα OECs 4ης γενιάς.

Συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές ανακαλλιέργειες μεταξύ τους, διαπιστώθηκε ότι, τα αντιγόνα KDR και CD45 εμφάνισαν παρόμοιες εκφράσεις. Στην περίπτωση των OECs της 4^{ης} ανακαλλιέργειας, παρατηρήθηκε μικρή μείωση της έκφρασης του CD34, σημαντική μείωση της έκφρασης του CD133, ενώ αντίθετα αυξημένη έκφραση του CD31 σε σύγκριση με τα OECs 1^{ης} γενιάς. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι καθώς αυξάνεται ο βαθμός της ανακαλλιέργειας εξαφανίζεται η έκφραση του aντιγόνου CD133, που δείχνει τον πρόδρομο χαρακτήρα των κυττάρων, ενώ παράλληλα ο ενδοθηλιακός χαρακτήρας των OECs αυξάνεται σημαντικά που προκύπτει από την έκφραση του CD31. Οπότε, τα OECs 4^{ης} γενιάς ουσιαστικά αποκτούν έναν αυξημένο ενδοθηλιακό φαινότυπο σε σύγκριση με τα OECs 1^{ης} γενιάς, τα οποία προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των απομονωμένων CD34⁺ κυττάρων.







Εικόνα 5.9: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των OECs κυττάρων, τα οποία έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια καλλιέργειας. **B)** Χαρακτηρισμός των OECs κυττάρων 1^{ης} ανακαλλιέργειας παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-KDR-PE, anti-CD31-PE και anti-CD133-PE. **Γ)** Χαρακτηρισμός των OECs κυττάρων 4^{ης} ανακαλλιέργειας παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-CD34-PE, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD34-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD45-PE,

ΙΙΙ. Με φθοριστικό μικροσκόπιο και μικροσκοπία συνεστιασμού

Στη συνέχεια, έγινε χρώση των OECs με DiI-ac-LDL και FITC-λεκτίνη. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με DiI-ac-LDL, όπου τα κύτταρα εμφάνισαν κόκκινο χρώμα (Εικόνα 5.10A). Επιπλέον, παρατηρήθηκε η εμφάνιση πράσινου χρώματος κατόπιν χρώσης των OECs με FITC-λεκτίνη (Εικόνα 5.10B). Επίσης, πραγματοποιήθηκε αλληλεπικάλυψη των παραπάνω εικόνων, όπου διαπιστώθηκε η εμφάνιση πορτοκαλί χρώματος στα OECs (Εικόνα 5.10Γ). Τέλος, ακολούθησε χρώση των OECs κυττάρων με vWF, όπου τα κύτταρα εμφάνισαν πράσινο χρώμα (Εικόνα 5.10Δ, Ε).



Εικόνα 5.10: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των OECs κυττάρων με DiI-ac-LDL. **B)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των OECs κυττάρων με FITC-λεκτίνη. **Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των OECs κυττάρων με DiI-ac-LDL και FITC-λεκτίνη.



Εικόνα 5.10: Δ), Ε) Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των OECs κυττάρων με vwF.

4. Βασικά χαρακτηριστικά των HUVECs

Ι. Με ανάστροφο μικροσκόπιο

Μια χαρακτηριστική εικόνα των HUVECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 5.11). Τα HUVECs κύτταρα έχουν ελλειψοειδές σχήμα και έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται και να εξαπλώνονται γρήγορα.



Εικόνα 5.11: Αντιπροσωπευτική εικόνα των HUVECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς όπου διακρίνεται η ικανότητα πολλαπλασιασμού και η μορφολογία τους.

ΙΙ. Με κυτταρομετρία ροής

Τα HUVECs κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ήταν 4^{ης} γενιάς και παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική ουρά (Εικόνα 5.12Α). Τα HUVECs παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση CD34 και KDR, αυξημένη έκφραση CD31, ενώ αντίθετα παρατηρείται μηδενική έκφραση των αντιγόνων CD45 και CD133 (Εικόνα 5.12B).





Εικόνα 5.12: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των HUVECs κυττάρων. **Β)** Χαρακτηρισμός των HUVECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-KDR-PE, anti-CD45-PE, anti-CD31-PE, anti-CD133-PE και anti-CD54-PE.

ΙΙΙ. Με φθοριστικό μικροσκόπιο και μικροσκοπία συνεστιασμού

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση των HUVECs με ac-LDL και FITCλεκτίνη (Εικόνες 5.13A, B). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η εμφάνιση κόκκινου χρώματος κατόπιν χρώσης των HUVECs με DiI-ac-LDL (Εικόνα 5.13A). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρώση των HUVECs με FITC-λεκτίνη, όπου τα κύτταρα εμφάνισαν πράσινο χρώμα (Εικόνα 5.13B). Μετά, έγινε αλληλοεπικάλυψη των παραπάνω εικόνων με αποτέλεσμα την εμφάνιση πορτοκαλί χρώματος (Εικόνα 5.13Γ). Τέλος, ακολούθησε χρώση των HUVECs με vWF, όπου εμφανίστηκε πράσινο χρώμα (Εικόνα 5.13Δ).



Εικόνα 5.13: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των HUVECs κυττάρων με DiI-ac-LDL. **B)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των HUVECs κυττάρων με FITC-λεκτίνη. **Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των HUVECs κυττάρων με Di-ac-LDL και FITC-λεκτίνη.



Εικόνα 5.13: Δ) Αντιπροσωπευτική εικόνα φθορισμού των HUVECs κυττάρων με vwF.

5. Χαρακτηρισμός των CD34⁺ κυττάρων

Ι. Με ανάστροφο μικροσκόπιο

Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζεται η ανάπτυξη των CD34⁺ κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από τα CB-MNCs (Εικόνες 5.14, 5.15). Συγκεκριμένα, στην εικόνα 5.14A, Β φαίνονται τα CD34⁺ κύτταρα την πρώτη μέρα καλλιέργειας, όπου διαπιστώνεται ο περιορισμένος αριθμός τους. Τα CD34⁺ είναι μικρά μονήρη κύτταρα με σφαιρικό σχήμα. Στη συνέχεια, τα CD34⁺ κύτταρα αναπτύχθηκαν και διαφοροποιήθηκαν μετά από δέκα και δεκαπέντε μέρες καλλιέργειας, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.15A, B.



Εικόνα 5.14: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των CD34⁺ κυττάρων την πρώτη μέρα καλλιέργειας. **Α)** μεγέθυνση 10X **B)** μεγέθυνση 40X, όπου τα κύτταρα είναι μικρά σε μέγεθος και ο αριθμός τους είναι περιορισμένος.



Εικόνα 5.15: Αντιπροσωπευτικές εικόνες καλλιέργειας των $CD34^+$ κυττάρων κατά τη διαφοροποίησή τους σε OECs. **A)** δέκατη μέρα καλλιέργειας **B)** δέκατη πέμπτη μέρα καλλιέργειας, όπου διαφαίνεται ο πολλαπλασιασμός και η εξάπλωση των κυττάρων.

ΙΙ. Με κυτταρομετρία ροής

Τα CD34⁺ κύτταρα παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.16B, βρέθηκε ότι τα CD34⁺ κύτταρα εκφράζουν μόνο το αντιγόνο CD34. Αντίθετα, το 30% περίπου των επιλεγμένων κυττάρων, τα οποία είναι θετικά στην πρωτεΐνη KDR δεν παρουσιάζουν καμία έκφραση, ένδειξη ότι δεν εκφράζουν ενδοθηλιακό φαινότυπο. Οι εκφράσεις μελετώνται στην παρακάτω επιλεγμένη περιοχή, όπου εντοπίζεται ο πληθυσμός των CD34⁺ κυττάρων τα οποία έχουν αποκολληθεί (Εικόνα 5.16A).



Εικόνα 5.16. Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής των CD34⁺ κυττάρων, τα οποία αποκολλούνται με PBS/5mM EDTA. **B)** Χαρακτηρισμός των CD34⁺ κυττάρων παρουσία των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-CD62P-PE, anti-PAC-1-FITC και anti-KDR-PE.

Συγκριτική αξιολόγηση των χαρακτηριστικών των τριών κυτταρικών πληθυσμών

Όπως προκύπτει από το χαρακτηρισμό των τριών διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών των EPCs, τα κύτταρα που παρουσιάζουν αυξημένο ενδοθηλιακό φαινότυπο ενώ αντίθετα δεν εκφράζουν δείκτες αιμοποιητικής/μονοκυτταρικής προέλευσης είναι τα OECs, τα οποία εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο με αυτόν των HUVECs. Τόσο τα CFU-Hill όσο και τα CACs κύτταρα εκφράζουν κυρίως CD14, CD45 καθώς και CD34 και CD133, ενώ εμφανίζουν έκφραση και των ενδοθηλιακών αντιγόνων CD31 και KDR.

Γ. Επίδραση των κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Αφού έγινε χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των διαφόρων κατηγοριών των EPCs, στη συνέγεια θελήσαμε να ερευνήσουμε την πιθανή επίδραση τόσο των κυττάρων όσο και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων με την τεχνική της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Μεθοδολογίες. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, έγινε επώαση των δειγμάτων μας με τα αιμοπετάλια σε διάφορες χρονικές στιγμές και στη συνέχεια ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές, όπως το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το Trap14 που είναι ανάλογο της θρομβίνης. Σε όλα τα πειράματα, ως δείγμα ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των CD34⁺ και των HUVECs κυττάρων, καθώς και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Πρέπει να τονιστεί ότι, η συγκέντρωση τόσο των CFU-Hill όσο και των CACs κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στο συσσωρευόμετρο ήταν 5×10^6 κύτταρα/ml. Αντίθετα, η συγκέντρωση των OECs, CD34⁺ και HUVECs ήταν 0.2x10⁶ κύτταρα/ml. Προκειμένου να υπάρχει ομοιογένεια στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων και των διαγραμμάτων, έγινε αναγωγή όλων των συγκεντρώσεων των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στο συσσωρευόμετρο στο 1x10⁶ κύτταρα/ml.

1. Επίδραση των CFU-Hill κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Το υπερκείμενο των CFU-Hill που παραλήφθηκε ήταν συμπυκνωμένο, βρισκόταν σε επαφή με τα κύτταρα για 2 μέρες και αντιστοιχούσε σε αριθμό κυττάρων που κυμαινόταν από 6,3-7,5 x 10⁶ κύτταρα. Οι τιμές αυτές προκύπτουν από τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας.

Διαπιστώνεται ότι, το υπερκείμενο (50 μl) των CFU-Hill κυττάρων δεν προκάλεσε αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης, αντίστοιχα στο 1 min επώασης (Εικόνα 5.17A, B). Παρομοίως, τα CFU-Hill κύτταρα δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση τόσο από το κολλαγόνο όσο και από τη θρομβίνη (Εικόνα 5.17A, B).



Εικόνα 5.17Α, Β: Γραφήματα στηλών που δείχνουν την επίδραση των CFU-Hill κυττάρων $(1 \times 10^6 \text{ κύτταρa/ml})$ και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η δράση του υπερκειμένου των CFU-Hill κυττάρων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων μετά από 3 min επώασης. Προέκυψε ότι, στα 3 min επώασης, το υπερκείμενο των CFU-Hill κυττάρων δεν ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο από το κολλαγόνο όσο και από τη θρομβίνη (Εικόνα 5.18A, B). Επιπλέον, τα CFU-Hill κύτταρα δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη (Εικόνα 5.18A, B).



Εικόνα 5.18Α, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την επίδραση των CFU-Hill κυττάρων $(1 \times 10^6 \text{ κύτταρa/ml})$ και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη στα 3 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι, το υπερκείμενο των CFU-Hill κυττάρων δεν ασκεί ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης στο 1 και στα 3 min επώασης. Παρομοίως, τα CFU-Hill κύτταρα δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη τόσο στο 1 όσο και στα 3 min επώασης.

2. Επίδραση των CACs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Το υπερκείμενο των CACs που παραλήφθηκε ήταν συμπυκνωμένο, βρισκόταν σε επαφή με τα κύτταρα για 2 μέρες και αντιστοιχούσε σε αριθμό κυττάρων που κυμαινόταν από 6,9-8,5 x 10⁶ κύτταρα. Οι τιμές προκύπτουν από τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας.

Στην αρχή έγιναν ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα συσσωρευομετρίας με τη θρομβίνη, όπου στα αιμοπετάλια παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των κυττάρων (control) παρατηρήθηκαν πολύ μικρές συσσωρεύσεις της τάξης του 5-10% σε σύγκριση με το δείγμα των αιμοπεταλίων απουσία του θρεπτικού μέσου (τυφλό) όπου οι τιμές ήταν 70-75%. Αντίθετα, παρουσία του αγωνιστή Trap14, το control παρουσίασε ελάχιστα μειωμένα ποσοστά συσσωρεύσεων συγκριτικά με το τυφλό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί πιθανότατα λόγω της παρουσίας της ηπαρίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων. Η ηπαρίνη χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό και δρα δεσμευόμενη στην αντιθρομβίνη μέσω ενός πεντασακχαρίτη. Η δέσμευση της ηπαρίνης στην αντιθρομβίνη ΙΙΙ επάγει μεταβολές στη στερεοδιάταξή της. Συνεπώς, η αντιθρομβίνη μπορεί να αναστείλει τη δράση της θρομβίνης και άλλων πρωτεασών που υπάρχουν στο πλάσμα. Έτσι, κρίθηκε αναγκαίο η παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των CACs κυττάρων να γίνεται χωρίς την προσθήκη της ηπαρίνης.

Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.19A, B, το υπερκείμενο των CACs δεν προκάλεσε αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14, αντίστοιχα στο 1 min επώασης. Παρομοίως, τα CACs κύτταρα δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης (Εικόνα 5.19A, B).



Εικόνα 5.19Α, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την επίδραση των CACs κυττάρων $(1x10^6 \text{ κύτταρα/ml})$ και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του υπερκειμένου των κυττάρων στη συσσώρευση μετά από 3 min επώασης. Διαπιστώθηκε ότι, το υπερκείμενο δεν ανέστειλε τη συσσώρευση από το κολλαγόνο ή το Trap14 (Εικόνα 5.20A, B). Επιπλέον, τα CACs κύτταρα δεν προκάλεσαν αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο από το κολλαγόνο όσο και από τη θρομβίνη στα 3 min επώασης (Εικόνα 5.20A, B).



Εικόνα 5.20Α, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την επίδραση των CACs κυττάρων ($1x10^6$ κύτταρα/ml) και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στα 3 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

Συμπερασματικά, το υπερκείμενο των CACs κυττάρων δεν προκάλεσε αναστολή στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 και στα 3 min επώασης. Τα CACs κύτταρα παρομοίως με το υπερκείμενο δεν βρέθηκε να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14 τόσο στο 1 όσο και στα 3 min επώασης.

3. Επίδραση των OECs και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Το υπερκείμενο των OECs που παραλήφθηκε από την καλλιέργεια ήταν συμπυκνωμένο, βρισκόταν σε επαφή με τα κύτταρα για 2 μέρες και αντιστοιχούσε σε

αριθμό κυττάρων που κυμαινόταν από 2,4-2,6 x 10⁶ κύτταρα. Οι τιμές προκύπτουν από τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του πλακιδίου.

Τα OECs κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πιθανή αναστολή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν 1ης, 2ης, 3ης και 4ης γενιάς. Επιπλέον, ερευνήθηκε η ενδεχόμενη επίδραση του υπερκειμένου των OECs στη συσσώρευση. Παρομοίως με τα CACs κύτταρα, στα OECs χρησιμοποιήθηκε το Trap14 και όχι η θρομβίνη λόγω της χρήσης του ίδιου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης.

Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.21A, B, το υπερκείμενο των OECs κυττάρων ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο από το κολλαγόνο όσο και από το Trap14 κατά 27,3±11,6% και 39,3±19,3%, αντίστοιχα στο 1 min επώασης. Επιπλέον, τα OECs κύτταρα προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αναστολή στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κατά 20,3±4,9% και 29,5±7,5% τόσο από το κολλαγόνο όσο και από το Trap14 αντίστοιχα, στο 1 min επώασης.



Εικόνα 5.21A, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την επίδραση των OECs κυττάρων $(1x10^6 \text{ κύτταρa/ml})$ και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,04, **p<0,03, ***p<0,03 και *p<0,02 σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης).

Επιπλέον, έγιναν διάφορα πειράματα όπου μελετήθηκε η δοσο- και χρονοεξαρτώμενη επίδραση των OECs κυττάρων στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,4 και 0,6x10⁶ κύτταρα/ml και στις χρονικές στιγμές επώασης 1, 3 και 6 min παρουσία του κολλαγόνου ή Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

του Trap14 (Εικόνες 5.22, 5.23, 5.24). Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.22, παρατηρείται ότι τα OECs κύτταρα $2^{\eta\varsigma}$ γενιάς ανέστειλαν με δοσο- και χρονοεξαρτώμενο τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία προκαλείται από το Trap14. Αναλυτικότερα, διαπιστώνεται ότι, τα OECs κύτταρα συγκέντρωσης 0,2x10⁶ και 0,4x10⁶ κύτταρα/ml εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό αναστολής στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά 48% και 13%, αντίστοιχα όταν αυξάνεται ο χρόνος επώασης από το 1 στα 3 min. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι, όταν χρησιμοποιείται το Trap14, τα OECs κύτταρα των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 και 0,4x10⁶ κύτταρα/ml) ανέστειλαν με παρόμοιο τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα 6 min επώασης. Αυτό υποδηλώνει ότι ο χρόνος επώασης στη συγκεκριμένη περίπτωση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα κύτταρα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση των OECs. Τέλος, στα 3 min επώασης ελέγχθηκε η επίδραση των OECs κυττάρων 0,6x10⁶ κύτταρα/ml στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, οπότε προέκυψε ποσοστό αναστολής 51%.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία έγιναν επωάσεις των OECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς με τα πλυμένα αιμοπετάλια στις συγκεντρώσεις 0,2 και 0,4x10⁶ κύτταρα/ml στα 1 και 3 min επώασης παρουσία του Trap14 (Εικόνα 5.23). Σε αυτή την περίπτωση, διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά αναστολών ήταν αυξημένα συγκριτικά με αυτά που προκλήθηκαν από τα OECs 2ης γενιάς, όπως φαίνεται από την εικόνα 5.22. Επιπλέον, τα ποσοστά αναστολών βρέθηκαν να είναι σχεδόν παρόμοια μεταξύ τους ανεξάρτητα από το χρόνο ή τη συγκέντρωση των κυττάρων μέσα στην κυψελίδα (Εικόνα 5.23). Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι η γενιά των OECs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων.



Εικόνα 5.22: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την χρονοεξαρτώμενη επίδραση των OECs κυττάρων 2^{ης} γενιάς δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων στα πλυμένα αιμοπετάλια παρουσία του Trap14.



Εικόνα 5.23: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την χρονοεξαρτώμενη επίδραση των OECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων στα πλυμένα αιμοπετάλια παρουσία του Trap14.

Στην εικόνα 5.24 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολών της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλούνται από τα OECs 4ης γενιάς στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,4 και

0,6x10⁶ κύτταρα/ml και χρόνους επώασης 1, 3 και 6 min παρουσία του κολλαγόνου. Στην περίπτωση που έχουμε συγκέντρωση OECs 0,2x10⁶ κύτταρα/ml, παρατηρείται μια χρονοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, στο 1 min επώασης προκύπτει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των ΟECs στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Επίσης, προκύπτει ότι, η αύξηση του χρόνου επώασης από το 1 στα 3 min των OECs κυττάρων συγκέντρωσης 0,4 και 0,6x10⁶ κύτταρα/ml με τα πλυμένα αιμοπετάλια οδηγεί σε μείωση των ποσοστών αναστολής της συσσώρευσης. Τέλος, διαπιστώνεται ότι, τα OECs συγκέντρωσης 0,2 και 0,4x10⁶ κύτταρα/ml αναστέλλουν με παρόμοιο τρόπο τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων.



Εικόνα 5.24: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την χρονοεξαρτώμενη επίδραση των OECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του υπερκειμένου των OECs στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων στο 1, στα 3 και στα 6 min επώασης, παρουσία τόσο του κολλαγόνου όσο και του Trap14. Αρχικά, το υπερκείμενο των OECs (50 μl) ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο από το κολλαγόνο όσο και από το Trap14 κατά 40% στο 1 min επώασης, με p<0,02 και για τις

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

δύο περιπτώσεις. Όταν χρησιμοποιήθηκε η μισή ποσότητα υπερκειμένου (25 μl), παρατηρήθηκε παρόμοια αναστολή στη συσσώρευση σε σύγκριση με την ποσότητα των 50 μl, παρουσία τόσο του κολλαγόνου όσο και του Trap14 (p<0,03).

Οσον αφορά τα 3 min επώασης του υπερκειμένου (50 μl) με τα πλυμένα αιμοπετάλια, το ποσοστό αναστολής (50%) στη συσσώρευση (p<0,05) ήταν σχετικά αυξημένο σε σύγκριση με το 1 min επώασης, παρουσία του Trap14. Αντίθετα, παρουσία του κολλαγόνου, παρατηρήθηκε 17% αναστολή (p<0,03), η οποία όμως ήταν μειωμένη σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με αυτή που προέκυψε στο 1 min επώασης (p<0,02). Στην περίπτωση της επώασης του υπερκειμένου (25 μl) με τα αιμοπετάλια παρουσία του Trap14, διαπιστώθηκε 43% αναστολή της συσσώρευσης (p<0,02), η οποία ήταν αυξημένη συγκριτικά με αυτή που προέκυψε στο 1 min επώασης (p<0,02), η οποία ήταν αυξημένη συγκριτικά με αυτή που προέκυψε στο 1 min επώασης (p<0,04). Τέλος, όταν έγινε 6 min επώαση των πλυμένων αιμοπεταλίων με το υπερκείμενο (50 μl), παρατηρήθηκε 17% αναστολή της συσσώρευσης (p<0,04), η οποία ήταν παρόμοια με αυτή που προέκυψε στα 3 min παρουσία του κολλαγόνου. Τέλος, στην περίπτωση του Trap14 προέκυψε 20% αναστολή (p<0,05), η οποία ήταν μειωμένη σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με αυτή που διαπιστώθηκε στα 3 min επώασης (p<0,04).

Τέλος, θελήσαμε να διερευνήσουμε το κατά πόσο οι αναστολές που παρατηρούνται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους διαφέρουν ανάλογα με τον αγωνιστή. Παρατηρείται ότι, τα OECs κύτταρα $4^{\eta\varsigma}$ γενιάς των συγκεντρώσεων 0,2 και 0,4 x 10⁶ κύτταρα/ml ανέστειλαν τη συσσώρευση κατά 45% και 53%, αντίστοιχα παρουσία του Trap14 (Εικόνα 5.25). Επιπλέον, τα OECs κύτταρα των συγκεντρώσεων 0,2 και 0,4 x 10⁶ κύτταρα/ml ανέστειλαν τη συσσώρευση κατά 16% και 26%, αντίστοιχα από το κολλαγόνο (Εικόνα 5.25). Επίσης, διαπιστώνεται ότι το υπερκείμενο των OECs κυττάρων $3^{\eta\varsigma}$ γενιάς αναστέλλει σε αυξημένο βαθμό τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο τόσο στο 1 όσο και στα 3 min επώασης (Εικόνα 5.26). Όπως φαίνεται από την εικόνα 5.26, όταν χρησιμοποιείται το Trap14, το υπερκείμενο των OECs εμφανίζει σχετικά αυξημένο ποσοστό αναστολής στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο VOECs παρουσιάζει σχεδόν παρόμοια ποσοστά αναστολής στη συσσώρευση από το κολλαγόνο στο 1 και στα 3 min επώασης.



Εικόνα 5.25: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση των OECs κυττάρων 4^{ης} γενιάς δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του Trap14 ή του κολλαγόνου.



Εικόνα 5.26: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση του υπερκειμένου των OECs κυττάρων 3^{ης} γενιάς (0,2x10⁶ κύτταρα/ml) στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του Trap14 ή του κολλαγόνου.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας, όπου φαίνεται η επίδραση των OECs κυττάρων συγκέντρωσης 0,2 x 10^6 και 0,4 x 10^6 κύτταρα/ml στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.27).

Συμπερασματικά, τόσο το υπερκείμενο των OECs όσο και τα ίδια τα κύτταρα βρέθηκε ότι αναστέλλουν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 min επώασης. Επιπλέον, παρατηρείται ότι υπάρχει δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη επίδραση των OECs κυττάρων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τέλος, το ποσοστό αναστολής της συσσώρευσης που προκύπτει από τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους παρουσία του Trap14 ήταν αυξημένο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό που προέκυψε από το κολλαγόνο.



Εικόνα 5.27: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας που δείχνουν τη δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των OECs κυττάρων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων.

4. Επίδραση των HUVECs και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Το υπερκείμενο των HUVECs που παραλήφθηκε από την καλλιέργεια ήταν συμπυκνωμένο, βρισκόταν σε επαφή με τα κύτταρα για 2 μέρες και αντιστοιχούσε σε αριθμό κυττάρων που κυμαινόταν από 2,0-2,2 x 10⁶ κύτταρα. Οι τιμές προκύπτουν από τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του πλακιδίου.

Τα HUVECs κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πιθανή αναστολή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν 3ης και 4ης γενιάς. Επιπλέον, ερευνήθηκε η ενδεχόμενη επίδραση των υπερκειμένων των HUVECs στη συσσώρευση. Η πειραματική διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που εφαρμόστηκε στα OECs, ενώ ως control χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων. Επιπλέον, το θρεπτικό μέσο παρασκευάστηκε χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης προκειμένου να αποτραπεί η μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων παρουσία του control.

Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.28A, B, τόσο τα HUVECs κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους αναστέλλουν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο και το Trap14 στο 1 min επώασης. Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο των HUVECs ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά 25,1±8,5% και 32,8±5,7% από το κολλαγόνο και το Trap14, αντίστοιχα στο 1 min επώασης. Επιπλέον, τα HUVECs κύτταρα προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αναστολή κατά 40,2±12,5% και 30,7±10,4% παρουσία του κολλαγόνου και του Trap14 αντίστοιχα, στο 1 min επώασης.



Εικόνα 5.28A, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την ανασταλτική δράση των HUVECs κυττάρων (1x10⁶ κύτταρα/ml) και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,01, **p<0,02, ***p<0,03 και *p<0,04 σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα 3 και στα 6 min επώασης χρησιμοποιώντας το κολλαγόνο και το Trap14 (Εικόνα 5.29A, B). Το υπερκείμενο των HUVECs ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά 23,6±6,2% και 32,4±10,9% στα 3 και 6 min επώασης, αντίστοιχα παρουσία του κολλαγόνου. Στη συνέχεια, όταν χρησιμοποιήθηκε το Trap14, παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από το υπερκείμενο κατά 47,3±13,7% και 31,7±13,5% στα 3 και 6 min επώασης, αντίστοιχα. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι, το υπερκείμενο των HUVECs ανέστειλε σε μεγαλύτερο βαθμό τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του Trap14 σε σύγκριση με τα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε το κολλαγόνο.



Εικόνα 5.29A, Β: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την ανασταλτική δράση του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων (1x10⁶ κύτταρα/ml) στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο και το Trap14 στα 3 και 6 min επώασης, αντίστοιχα. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,03, **p<0,04, ***p<0,02 και *p<0,03 σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης).

Μελετήθηκε επίσης η πιθανή ανασταλτική δράση των HUVECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία της θρομβίνης στο 1 min επώασης (Εικόνα 5.30). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η δοσοεξαρτώμενη δράση των HUVECs 4^{ης} γενιάς στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων στο 1 min επώασης παρουσία του κολλαγόνου, της θρομβίνης και του

Trap14. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,2 x 10⁶, 0,4 x 10⁶ και 0,6 x 10⁶ κύτταρα/ml. Όπως φαίνεται από την εικόνα 5.31, η μέγιστη ανασταλτική δράση (67%) παρατηρείται στη συγκέντρωση 0,4 x 10⁶ κύτταρα/ml και όχι στα 0,6x10⁶ κύτταρα/ml. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα λόγω της μεγάλης τους συγκέντρωσης παρουσιάζουν κορεσμό. Επιπλέον, από το σχήμα προκύπτει η ανασταλτική δράση σε μικρό βαθμό της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων από τα HUVECs παρουσία της θρομβίνης. για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τους άλλους δύο.



Εικόνα 5.30: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την ανασταλτική δράση των HUVECs κυττάρων (1x10⁶ κύτταρα/ml) και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm SD από 3 πειράματα (*p<0,04 σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια παρουσία του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης).



Εικόνα 5.31: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που εμφανίζουν τα ποσοστά αναστολών που προκαλούν τα HUVECs κύτταρα 4^{ης} γενιάς σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,2, 0,4 και 0,6x10⁶ κύτταρα/ml) στο 1 min επώασης.

Σε ένα άλλο πείραμα, εξετάστηκε η χρονοεξαρτώμενη δράση των κυττάρων στη συσσώρευση παρουσία του κολλαγόνου (Εικόνα 5.32). Οι συγκεντρώσεις των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη συσσωρευομετρία ήταν 0,2 x 10⁶ και 0,4 x 10⁶ κύτταρα/ml. Διαπιστώνεται ότι η μέγιστη ανασταλτική δράση υπάρχει στα 6 min επώασης, που μπορεί να οφείλεται στον μεγαλύτερο χρόνο επώασης των HUVECs με τα αιμοπετάλια. Όμως στα 3 min επώασης, παρατηρείται μια μείωση του ποσοστού της αναστολής σε σύγκριση με την αναστολή που προέκυψε στο 1 min επώασης.



Εικόνα 5.32: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά ανασταλτικής δράσης των HUVECs κυττάρων 3^{ης} γενιάς στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο στα 1, 3 και 6 min επώασης.

Τέλος, μελετήθηκε η ενδεχόμενη επίδραση του υπερκειμένου των HUVECs στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14 στα 3 και 6 min επώασης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, οι όγκοι του υπερκειμένου που τοποθετήθηκαν στην κυψελίδα ήταν 50 και 25 μl. Στα συγκεκριμένα πειράματα, παρατηρήθηκε μικρή αναστολή της συσσώρευσης από το υπερκείμενο στο 1 min επώασης, οπότε δεν θεωρήθηκε αναγκαίο να ερευνηθεί η επίδραση των 25 μl υπερκειμένου στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, όταν έγινε 3 min επώαση των αιμοπεταλίων με τα 25 μl υπερκειμένου, παρατηρήθηκε μειωμένο ποσοστό ανασταλτικής δράσης σε σύγκριση με αυτή που προέκυψε όταν χρησιμοποιήθηκε ο όγκος των 50 μl, τόσο παρουσία του κολλαγόνου όσο και του Trap14. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει μείωση της ποσότητας του υπερκειμένου κατά το ήμισυ. Εντούτοις, στην περίπτωση των 6 min επώασης διαπιστώθηκε παρόμοια συμπεριφορά του υπερκειμένου των HUVECs ως προς την αναστολή στη συσσώρευση παρουσία και των δύο αγωνιστών είτε χρησιμοποιήθηκαν τα 25 είτε τα 50 μl υπερκειμένου.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας, όπου φαίνεται η επίδραση των HUVECs κυττάρων συγκέντρωσης 0,2 x 10^6 και 0,4 x 10^6 κύτταρα/ml στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.33).



Χρόνος (min:sec)

Εικόνα 5.33: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας που δείχνουν τη δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των HUVECs κυττάρων στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων.

Συμπερασματικά, τόσο τα HUVECs κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14 στο 1 min επώασης. Επιπλέον, παρατηρείται χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα HUVECs κύτταρα και το υπερκείμενο τους. Τέλος, διαπιστώνεται ότι, τα HUVECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους ανέστειλαν περισσότερο τη συσσώρευση από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο.

5. Επίδραση των CD34⁺ κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Το υπερκείμενο των $CD34^+$ κυττάρων που παραλήφθηκε από την καλλιέργεια ήταν συμπυκνωμένο, βρισκόταν σε επαφή με τα κύτταρα για $1-1^{1/2}$ μέρες και αντιστοιχούσε σε

αριθμό κυττάρων που κυμαινόταν από 0,4-1,0 x 10⁶ κύτταρα. Οι τιμές προκύπτουν από τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του πλακιδίου.

Τα παρακάτω αποτελέσματα προέκυψαν από πειράματα όπου έγινε απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων από δύο διαφορετικούς δότες την ίδια πειραματική μέρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επίδραση τόσο των κυττάρων όσο και των υπερκειμένων τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Βρέθηκε ότι, το υπερκείμενο (50μl) των CD34⁺ κυττάρων δεν ανέστειλε τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία της θρομβίνης (Εικόνα 5.34). Παρομοίως, τα CD34⁺ κύτταρα δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία της θρομβίνης στο 1 min επώασης, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.34.



Εικόνα 5.34: Γραφήματα στηλών που παρουσιάζουν την ανασταλτική δράση των $CD34^+$ κυττάρων (1x10⁶ κύτταρα/ml) και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη στο 1 min επώασης. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 3 πειράματα.

Εντούτοις, η συσσώρευση που προέκυψε από τα κύτταρα ήταν περίπου 10% αυξημένη σε σύγκριση με αυτή του control. Προκειμένου να διαλευκανθεί κατά πόσο τα συγκεκριμένα κύτταρα λειτουργούν ως ενεργοποιητές, χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα ως αγωνιστή και παρατηρήθηκε ότι προξένησαν 3% συσσώρευση. Συνεπώς, προκύπτει ότι τα CD34⁺ κύτταρα δεν ενεργοποιούν τα πλυμένα αιμοπετάλια.

Συμπερασματικά, τόσο τα CD34⁺ κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη. Επιπλέον, τα CD34⁺ κύτταρα δεν ενεργοποιούν τα πλυμένα αιμοπετάλια.

Δ. Επίδραση των κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το χαρακτηρισμό των κυττάρων καθώς επίσης και την επίδρασή τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων διαπιστώνεται ότι η υποκατηγορία των EPCs που φαίνεται ότι παρουσιάζει μεγαλύτερο βιολογικό ενδιαφέρον είναι τα OECs. Για αυτό το λόγο, θελήσαμε να εμβαθύνουμε περισσότερο μελετώντας την πιθανή επίδραση των συγκεκριμένων κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρίας ροής.

Αρχικά, στην πειραματική μας διαδικασία διερευνήθηκε η επίδραση των OECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα οποία δεν ήταν προσκολλημένα στα κύτταρα ("ελεύθερα ή μη προσκολλημένα αιμοπετάλια"). Η επίδραση έγινε με τους παρακάτω τρόπους:

i) Με τον υπολογισμό της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) στα ενεργοποιημένα και μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των OECs,

ii) Με τον υπολογισμό του ποσοστού των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (% Gated) παρουσία και απουσία των OECs, τα οποία είναι διπλοθετικά (UR) στα φθορισμένα αντισώματα PAC-1 και CD61 (PAC-1⁺/CD61⁺), καθώς και CD62P και CD61 (CD62P⁺/CD61⁺).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των OECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα οποία ήταν προσκολλημένα στα κύτταρα ("προσκολλημένα αιμοπετάλια"). Αρχικά, υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD31 και του CD61 (CD31⁺/CD61⁺). Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένα προσκολλημένα αιμοπετάλια καθώς και στα μη ενεργοποιημένα προσκολλημένα αιμοπετάλια.

Τέλος, οι παραπάνω παράμετροι υπολογίστηκαν για τα HUVECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους καθώς και για τα CD34⁺ κύτταρα.

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

1. α) Επίδραση των OECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των "ελεύθερων" αιμοπεταλίων

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού των αιμοπεταλίων σε ηρεμία καθώς και ενεργοποιημένων με τον αγωνιστή ADP συγκέντρωσης 50μM. Σε αυτή την περιοχή μελετάται η επίδραση των ΟECs κυττάρων και των υπερκειμένων τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.35A, B).



Εικόνα 5.35A, Β: Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ πληθυσμού μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.

i) Με τον υπολογισμό της μέσης έντασης φθορισμού (MFI)

Η επίδραση των OECs κυττάρων (συγκέντρωσης 1x10⁶ κύτταρα/ml) στην ενεργοποίηση των "ελεύθερων αιμοπεταλίων" απεικονίζεται στην εικόνα 5.36A, B, όπου φαίνεται ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση τόσο του PAC-1, όσο και του CD62P σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των OECs. Παρομοίως, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του PAC-1 και του CD62P παρουσία του υπερκειμένου των OECs κυττάρων σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αυροπετάλια παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του PAC-1 και του CD62P παρουσία του υπερκειμένου των OECs κυττάρων σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αυροπετάλια που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα ελέγχου (Εικόνα 5.37A, B).



Εικόνα 5.36A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση των OECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P (το αρνητικό πρόσημο δηλώνει την απουσία των OECs, ενώ το θετικό πρόσημο την παρουσία των OECs). Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,04, ^{**}p<0,03 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των OECs κυττάρων).



Εικόνα 5.37A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση του υπερκειμένου των OECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P (το αρνητικό πρόσημο δηλώνει την απουσία, ενώ το θετικό πρόσημο την παρουσία του υπερκειμένου των OECs). Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,02, **p<0,02 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία του υπερκειμένου των OECs κυττάρων).
ii) Με τον υπολογισμό του ποσοστού των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (% Gated) παρουσία και απουσία των OECs, τα οποία είναι διπλοθετικά (UR) στα φθορισμένα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και CD62P και CD61.

Η επίδραση τόσο των κυττάρων όσο και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων γίνεται με τον υπολογισμό του ποσοστού των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (% Gated), τα οποία είναι διπλοθετικά (UR) στα φθορισμένα αντισώματα PAC-1 και CD61 (Εικόνα 5.38A, B), καθώς και CD62P και CD61 (Εικόνα 5.39A, B).



Εικόνα 5.38A, B: Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν το ποσοστό των αιμοπεταλίων, τα οποία είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61 στη μη ενεργοποιημένη και ενεργοποιημένη κατάσταση, αντίστοιχα.



Εικόνα 5.39A, B: Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν το ποσοστό των αιμοπεταλίων, τα οποία είναι διπλοθετικά στα αντισώματα CD62P και CD61 στη μη ενεργοποιημένη και ενεργοποιημένη κατάσταση, αντίστοιχα.

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των OECs κυττάρων εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μειωμένο ποσοστό PAC-1⁺/CD61⁺ και CD62P⁺/CD61⁺ σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων απουσία των OECs (Εικόνα 5.40A, Β). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο των OECs κυττάρων (Εικόνα 5.41A, Β).



Εικόνα 5.40A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα CD62P και CD61 στα μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των OECs κυττάρων $(1x10^6 \text{ κύτταρa/ml})$. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,02 και ^{**}p<0,03 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των OECs κυττάρων).



Εικόνα 5.41A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα CD62P και CD61 στα μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία του υπερκειμένου των OECs κυττάρων. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,02 και ^{**}p<0,02 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία του υπερκειμένου των OECs κυττάρων.

β) Επίδραση των OECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των "προσκολλημένων αιμοπεταλίων"

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα του μεικτού πληθυσμού OECs και "προσκολλημένων αιμοπεταλίων" σε συνάρτηση με το μέγεθος και την κοκκίωσή τους. Σε αυτή την περιοχή μελετάται η επίδραση των OECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.42).



Εικόνα 5.42: Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ του μεικτού πληθυσμού OECs και "προσκολλημένων αιμοπεταλίων" συναρτήσει του FSC και SSC.

Αρχικά, υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD31 και του CD61. Στη συνέχεια, στην επιλεγμένη περιοχή παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα OECs (εκφρασμένη ως % CD31⁺/CD61⁺) ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (66,2±4,6% έναντι 57,7±6,3%, p<0,01) (Εικόνα 5.43). Προκύπτει ότι, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα OECs κύτταρα κατά 12,8±5,2%. Εντούτοις, οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένω προσκολλημένα αιμοπετάλια ήταν παρόμοιοι με αυτούς των μη ενεργοποιημένων προσκολλημένων αιμοπεταλίων (0,013±0,007 έναντι 0,010±0,007 και 0,039±0,033 έναντι 0,037±0,030, p=NS) (Εικόνα 5.44A, B). Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει ότι υπάρχει αναστολή της ενεργοποίησης των προσκολλημένων αιμοπεταλίων από τα OECs κύτταρα.



Εικόνα 5.43: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των OECs κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD31 και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,01 σε σύγκριση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των OECs κυττάρων).



Εικόνα 5.44A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των OECs κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την **A**) έκφραση του PAC-1 και του CD61, καθώς και την **B**) έκφραση του CD62P και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

2. α) Επίδραση των HUVECs κυττάρων και των υπερκειμένων τους στην ενεργοποίηση των "ελεύθερων" αιμοπεταλίων

i) Με τον υπολογισμό της μέσης έντασης φθορισμού (MFI)

Η επίδραση των HUVECs κυττάρων (συγκέντρωσης 1x10⁶ κύτταρα/ml) στην ενεργοποίηση των "ελεύθερων αιμοπεταλίων" απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, όπου φαίνεται ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση τόσο του PAC-1, όσο και του CD62P σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των HUVECs (Εικόνα 5.45A, B). Παρομοίως, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του CD62P παρουσία του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία του υπερκειμένου των HUVECs



Εικόνα 5.45A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση των HUVECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm SD από 4 πειράματα (^{**}p<0,02 και ^{**}p<0,03 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των HUVECs κυττάρων).



Εικόνα 5.46A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm SD από 4 πειράματα (*p<0,03 και **p<0,02 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία του υπερκειμένου των HUVECs).

 ii) Με τον υπολογισμό του ποσοστού των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (% Gated) παρουσία και απουσία των OECs, τα οποία είναι διπλοθετικά (UR) στα φθορισμένα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και CD62P και CD61.

Διαπιστώθηκε ότι, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των HUVECs κυττάρων εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μειωμένο ποσοστό PAC-1⁺/CD61⁺ και CD62P⁺/CD61⁺ σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων απουσία των HUVECs (Εικόνα 5.47A, Β). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο των HUVECs κυττάρων (Εικόνα 5.48A, Β).



Εικόνα 5.47A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα CD62P και CD61 στα μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των HUVECs κυττάρων. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,02 και ^{**}p<0,05 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των HUVECs κυττάρων).



Εικόνα 5.48Α, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα CD62P και CD61 στα μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,01 και ^{**}p<0,04 σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία του υπερκειμένου των HUVECs κυττάρων).

Αποτελέσματα

2. β) Επίδραση των HUVECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των "προσκολλημένων" αιμοπεταλίων

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα του μεικτού πληθυσμού των "προσκολλημένων αιμοπεταλίων" με τα HUVECs. Σε αυτή την περιοχή μελετάται η επίδραση των HUVECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.49). Ακολουθήθηκε η διαδικασία που εφαρμόστηκε προηγουμένως στα OECs κύτταρα. Στην επιλεγμένη περιοχή παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα HUVECs (εκφρασμένη ως % CD31⁺/CD61⁺) ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (46,4±7,0% έναντι 30,9±5,5%, p<0,02) (Εικόνα 5.50). Προκύπτει ότι, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα HUVECs κύτταρα κατά 33,4±6,1%. Εντούτοις, οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένων προσκολλημένων αιμοπεταλίων (0,020±0,018 έναντι 0,018±0,009 και 0,070±0,068 έναντι 0,063±0,046, p=NS) (Εικόνα 5.51A, B). Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει ότι υπάρχει αναστολή της ενεργοποίησης των προσκολλημένων αιμοπεταλίων από τα HUVECs κύτταρα.



Εικόνα 5.49: Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ του μεικτού πληθυσμού HUVECs και προσκολλημένων αιμοπεταλίων συναρτήσει των παραμέτρων FSC και SSC.



Εικόνα 5.50: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των HUVECs κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD31 και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,02 σε σύγκριση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των HUVECs κυττάρων).



Εικόνα 5.51A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των HUVECs κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την **A**) έκφραση του PAC-1 και του CD61, καθώς και την **B**) έκφραση του CD62P και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.

Αποτελέσματα

3. α) Επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των "ελεύθερων" αιμοπεταλίων

Όπως στην περίπτωση της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας, έτσι και στην τεχνική της κυτταρομετρίας ροής στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τόσο μέσω της έκφρασης του PAC-1 όσο και του CD62P (ως τιμές MFI). Συγκεκριμένα, τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια χωρίς την παρουσία των κυττάρων παρουσίασαν εκφράσεις 1,55±0,53 και 2,60±0,47 για το PAC-1 και το CD62P, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίησή τους με το ADP εμφάνισαν MFI 32,42±3,57 και 79,94±7,78 για το PAC-1 και το CD62P. Όταν έγινε επώαση των αιμοπεταλίων παρουσία των CD34⁺ κυττάρων, οι εκφράσεις που παρατηρήθηκαν στην μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων παρουσίασαν έκφραση όταν 1,07±0,32 για το PAC-1 και 3,54±0,78 για το CD62P. Έπιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων παρουσίασαν έκφραση όταν 1,07±0,32 για το CD62P. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 5.52A, Β, όπου φαίνεται ότι τα CD34⁺ κύτταρα δεν αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P.

Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό των αιμοπεταλίων που ήταν διπλοθετικά ως προς τα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα αντισώματα CD62P και CD61 (% Gated), τόσο στην ενεργοποιημένη όσο και στη μη ενεργοποιημένη μορφή τους παρουσία και απουσία των κυττάρων. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μεθοδολογία, διαπιστώθηκε ξανά ότι δεν υπήρχε επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (5.53A, B).



Εικόνα 5.52A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν την επίδραση των $CD34^+$ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της έκφρασης του PAC-1 και του CD62P. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα.



Εικόνα 5.53Α, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που είναι διπλοθετικά στα αντισώματα PAC-1 και CD61, καθώς και στα CD62P και CD61 στα μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία των CD34⁺ κυττάρων. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm SD από 4 πειράματα.

Αποτελέσματα

3. β) Επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των "προσκολλημένων" αιμοπεταλίων

Στην εικόνα 5.54 απεικονίζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα του μεικτού πληθυσμού των "προσκολλημένων αιμοπεταλίων" με τα CD34⁺ κύτταρα. Σε αυτή την περιοχή μελετάται η επίδραση των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που εφαρμόστηκε προηγουμένως στα OECs και HUVECs κύτταρα. Στην επιλεγμένη περιοχή παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα CD34⁺ (εκφρασμένη ως % CD34⁺/CD61⁺) ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (25,9±9,3% έναντι 12,6±5,5%, p<0,03) (Εικόνα 5.55). Προκύπτει ότι, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα CD34⁺ κύτταρα κατά 49,8±6,1%. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένω προσκολλημένων αιμοπεταλίων (Εικόνα 5.56A, B). Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει ότι δεν παρατηρείται αναστολή της ενεργοποίησης των προσκολλημένων αιμοπεταλίων ατα CD34⁺ κύτταρα.



Εικόνα 5.54: Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ του μεικτού πληθυσμού των CD34⁺ κυττάρων και των προσκολλημένων αιμοπεταλίων συναρτήσει των παραμέτρων FSC και SSC.



Εικόνα 5.55: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των $CD34^+$ κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD34 και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (^{*}p<0,02 σε σύγκριση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των CD34⁺ κυττάρων).



Εικόνα 5.56A, Β: Γραφήματα στηλών που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία των $CD34^+$ κυττάρων τα οποία είναι διπλοθετικά ως προς την **A**) έκφραση του PAC-1 και του CD61, καθώς και την **B**) έκφραση του CD62P και του CD61. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± SD από 4 πειράματα (*p<0,02 και **p<0,01 σε σύγκριση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των CD34⁺ κυττάρων).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6[°]

Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αρχικά η ανάπτυξη για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας μεθόδων για την καλλιέργεια των διαφόρων κατηγοριών των EPCs, καθώς επίσης και η διαδικασία απομόνωσης των CD34⁺ κυττάρων από CB. Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε την ενδεχόμενη ανασταλτική δράση των κυτταρικών σειρών των EPCs που αναπτύχθηκαν καθώς και των CD34⁺ και των HUVECs κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα κύρια ευρήματα της μελέτης ήταν τα εξής:

1. Τα CFU-Hill κύτταρα εμφάνισαν το χαρακτηριστικό σχήμα των αποικιών, όπου παρατηρήθηκε ένα κεντρικό σύμπλεγμα κυττάρων με επιμήκη κύτταρα στην περιφέρεια. Επιπλέον, με την κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε ότι τα CFU-Hill εκφράζουν κυρίως τους δείκτες των πρόδρομων κυττάρων CD34 και CD133, καθώς επίσης τα αντιγόνα CD45 και CD14 υποδεικνύοντας την αιμοποιητική/μονοκυτταρική φύση των κυττάρων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι εκφράζουν KDR υποδηλώνοντας ότι παράλληλα εμφανίζουν ενδοθηλιακό φαινότυπο. Τέλος, με τη μικροσκοπία συνεστιασμού παρατηρήθηκε χρώση των κυττάρων με ac-LDL και λεκτίνη. Τα κύτταρα τα οποία παρουσίασαν φθορισμό τόσο για την ac-LDL όσο και για τη λεκτίνη ταυτοποιήθηκαν ως CFU-Hill.

2. Τα CACs κύτταρα ήταν μονήρη και εμφάνισαν κυρίως σφαιρικό σχήμα ενώ ορισμένα εξ' αυτών ήταν ατρακτοειδή. Κυτταρομετρικά, τα CACs διαπιστώθηκε ότι εκφράζουν κυρίως CD45, CD14, KDR και CD31. Επιπλέον, παρουσίασαν έκφραση σε μικρό βαθμό των αντιγόνων CD34 και CD133. Τα κύτταρα τα οποία εμφάνισαν φθορισμό τόσο για την ac-LDL όσο και για τη λεκτίνη προσδιορίστηκαν ως CACs. Τέλος, τα CACs κύτταρα παρουσίασαν έκφραση του vWF.

3. Τα OECs παρουσίασαν ελλειψοειδές σχήμα και μορφολογία παρόμοια με αυτή των HUVECs. Επιπλέον, τα OECs εμφάνισαν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης. Διαπιστώθηκε ότι όταν αυξάνεται ο βαθμός ανακαλλιέργειας των OECs από την 1^η στην 4^η, βελτιώνεται ο χαρακτηριστικός τους ενδοθηλιακός φαινότυπος, ενώ παράλληλα μειώνεται σημαντικά η έκφραση του πρόδρομου δείκτη CD133. Τα κύτταρα

Συζήτηση

τα οποία εμφάνισαν πρόσληψη της ac-LDL και δέσμευση της λεκτίνης ταυτοποιήθηκαν ως OECs. Τέλος, τα OECs κύτταρα εμφάνισαν έκφραση του vWF.

4. Αντίθετα, τα CD34⁺ κύτταρα από τα οποία προήλθαν τα OECs ήταν μικρά μονήρη κύτταρα με σφαιρικό σχήμα. Όπως αναμενόταν, τα CD34⁺ είχαν αυξημένη έκφραση του CD34 χωρίς να υπάρχει καμία ένδειξη ενδοθηλιακού φαινοτύπου.

5. Τόσο τα CFU-Hill κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο από το κολλαγόνο όσο και από τη θρομβίνη.

6. Τα CACs κύτταρα, καθώς και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14.

7. Τόσο τα OECs κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14. Παρατηρήθηκε ότι όταν αυξάνεται ο ενδοθηλιακός φαινότυπος των OECs από την 1^η στην 4^η ανακαλλιέργεια προκύπτει αυξημένο ποσοστό αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα κύτταρα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα ΟECs κύτταρα. Ένα πολύ σημαντικό εύρημα είναι ότι, τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους αναστέλλουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο.

8. Τα CD34⁺ κύτταρα και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη.

9. Τα ελεύθερα αιμοπετάλια τα οποία δεν είναι προσκολλημένα στα CD34⁺, OECs και HUVECs κύτταρα ενεργοποιούνται. Τα OECs, καθώς και τα HUVECs κύτταρα και τα υπερκείμενά τους ανέστειλαν την ενεργοποίηση των ελεύθερων αιμοπεταλίων. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τα CD34⁺ κύτταρα και το υπερκείμενό τους.

10. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP επάγει την προσκόλλησή τους στα OECs, στα CD34⁺ και στα HUVECs κύτταρα.

 Διαπιστώθηκε ότι, τα προσκολλημένα αιμοπετάλια είτε στα OECs είτε στα HUVECs κύτταρα δεν ενεργοποιούνται. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στα CD34⁺ κύτταρα.

Χαρακτηρισμός των διαφόρων κατηγοριών των EPCs

Ταυτοποίηση των EPCs

Αρχικά, ο Asahara και οι συνεργάτες του το 1997 περιέγραψαν τα EPCs ως προς την έκφραση των επιφανειακών αντιγόνων, τη μορφολογία και την ικανότητά τους να ενσωματώνονται σε αγγεία [202, 258]. Τα EPCs εκφράζουν στην κυτταρική τους επιφάνεια τα αντιγόνα CD34, KDR και CD133 [199, 202, 211, 292]. Επιπλέον, τα EPCs θεωρούνται ως ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ECs και ορίζονται συνήθως ως CD34⁺/KDR⁺ κύτταρα [184, 196, 200, 433]. Στη διεθνή επιστημονική κοινότητα δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη μια εξειδικευμένη και ευαίσθητη μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των EPCs. Παρόλα αυτά, δύο διαφορετικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται για την απομόνωσή τους: α) η επιλογή υποπληθυσμών βασισμένη σε αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων χρησιμοποιώντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και β) κυτταρικές καλλιέργειες, όπου οι πιθανοί πληθυσμοί των EPCs είναι τρεις, τα CFU-Hill και τα CACs που ονομάζονται αλλιώς πρώιμα EPCs (early EPCs) [258, 259] και τέλος τα OECs που ονομάζονται προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (late EPCs, OECs, ECFCs ή BOECs) [203, 205, 217, 258, 259, 304, 434, 435].

α) Αντιγονικός φαινότυπος των EPCs στο περιφερικό αίμα

Για να προσδιοριστεί ο αντιγονικός φαινότυπος των EPCs σύμφωνα με την έννοια "πρόδρομα ενδοθηλιακά", θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί τουλάχιστον ένας δείκτης ανωριμότητας των κυττάρων και ένας δείκτης ενδοθηλιακής προέλευσης [196]. Ο αντιγονικός φαινότυπος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μας για την ανίχνευση των EPCs στο περιφερικό αίμα ήταν ο CD34⁺/KDR⁺. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με διάφορες κλινικές μελέτες που έχουν γίνει [261, 436, 437]. Από τα πειράματα μας, βρέθηκε ότι τα CD34⁺/KDR⁺ κύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στην κυκλοφορία του αίματος, όπως έχει παρατηρηθεί και στη βιβλιογραφία [196, 438]. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι φαινότυποι CD133⁺/KDR⁺ και CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺, αλλά πιο σπάνια όμως σε σύγκριση με το φαινότυπο CD34⁺/KDR⁺ [196, 275, 276]. Ο φαινότυπος CD133⁺/KDR⁺ δεν προτιμάται επειδή η πρωτεΐνη CD133 εκφράζεται σε πιο ανώριμα κύτταρα από ότι το αντιγόνο CD34, καθιστώντας πιο σπάνια τα συγκεκριμένα

Συζήτηση

κύτταρα, οπότε και πιο δύσκολο να απομονωθούν. Επιπλέον, τα CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ κύτταρα είναι τόσο σπάνια στην κυκλοφορία που είναι αρκετά δύσκολο να ταυτοποιηθούν. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν CD34⁺ κύτταρα, τα οποία θεωρούνται περισσότερο HPCs και όχι EPCs, αφού πολύ μικρό ποσοστό των συγκεκριμένων κυττάρων όταν είναι στην κυκλοφορία εκφράζουν αντιγόνα ενδοθηλιακής προέλευσης [196]. Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι, ο ορισμός των EPCs είναι σύνθετος εξαιτίας της απουσίας ενός μοναδικού εξειδικευμένου επιφανειακού δείκτη για αυτά τα κύτταρα [196, 199, 439].

β) Κυτταρικές καλλιέργειες των EPCs

Ένα άλλο κριτήριο προσδιορισμού των EPCs είναι η ικανότητα πολλαπλασιασμού και ανάπτυξής τους, η οποία αξιολογείται μέσω της κυτταρικής καλλιέργειας. Αξίζει να αναφερθεί ότι, τα EPCs περιλαμβάνουν ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως κύτταρα μυελοειδούς ή ενδοθηλιακής προέλευσης [291, 292]. Όλοι αυτοί οι πιθανοί πληθυσμοί των EPCs συνεισφέρουν στο σχηματισμό και στη διατήρηση της ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων [203, 291, 292, 302]. Μέγρι τώρα, έγουν αναπτυχθεί τρεις μεθοδολογίες για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των πιθανών EPCs από ανθρώπινα MNCs [258, 259]. Στην πρώτη μέθοδο, στα πειράματα μας στοχεύσαμε στην απομάκρυνση των ώριμων ECs, τα οποία μπορεί να επιμολύνουν το δείγμα μας, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία [202, 289, 290]. Στη συνέχεια, τα μειωμένης πυκνότητας PB-MNCs τοποθετήθηκαν σε πλακίδια καλλιέργειας καλυμμένα με φιβρονεκτίνη, ώστε να σχηματίσουν αποικίες μετά από 5 ως 9 μέρες. Αυτές οι αποικίες αναφέρονται ως CFU-Hill ή CFUs [202, 291-293]. Η δεύτερη μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε στο εργαστήριο με σκοπό την ταυτοποίηση των πιθανών EPCs περιλαμβάνει την καλλιέργεια των PB-MNCs πάνω σε μια επικαλυμμένη με φιβρονεκτίνη επιφάνεια κάτω από συνθήκες ενδοθηλιακής διαφοροποίησης για τέσσερις μέρες χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας καθώς και αυξητικούς παράγοντες. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνθηκαν και παρέμειναν τα προσκολλημένα κύτταρα στην επιφάνεια καλλιέργειας για δύο ως τρεις μέρες ακόμη. Τα συγκεκριμένα κύτταρα ονομάζονται CACs [293, 300]. Η τελική μέθοδος που εφαρμόστηκε στη μελέτη μας πραγματεύεται την απομόνωση με μαγνητικό διαχωρισμό των CD34⁺ κυττάρων από τα CB-MNCs και τη διαφοροποίησή τους μετά από 1 μήνα καλλιέργειας προς OECs παρουσία θρεπτικού μέσου που περιέχει αυξητικούς παράγοντες,

Συζήτηση

όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία [209, 210, 440]. Εντούτοις, σε πολλές έρευνες που έχουν γίνει απομονώνονται MNCs από διάφορες πηγές, όπως PB, BM και CB για την καλλιέργεια και τη διαφοροποίησή τους χωρίς να έχει γίνει προηγουμένως θετική επιλογή των CD34⁺ κυττάρων [304, 434, 435]. Στην έρευνα μας απομονώσαμε CB-MNCs επειδή είναι γνωστό ότι τα συγκεκριμένα MNCs είναι αρκετά εμπλουτισμένα στα CD34⁺ κύτταρα [441, 442].

Ο ορισμός των EPCs βασισμένος σε πρωτόκολλα καλλιέργειας παρουσιάζει όμως ορισμένα προβλήματα που δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Για παράδειγμα, όταν η διαδικασία μιας καλλιέργειας έχει ξεκινήσει, τα κύτταρα τα οποία προκύπτουν πιθανώς δεν είναι παρόμοια με αυτά που υπάρχουν μέσα στον οργανισμό μας, in vivo. Τα καλλιεργημένα κύτταρα προέρχονται από τα κυκλοφορούντα κύτταρα, αλλά αυτό που ουσιαστικά δεν είναι σαφές μέχρι σήμερα είναι το αν τα κυκλοφορούντα κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται in vitro, είναι κύτταρα που λειτουργούν ως EPCs και μέσα στον οργανισμό μας (in vivo) χωρίς όμως να χρειάζεται να καλλιεργηθούν. Ακόμη και η πραγματοποίηση απλών κυτταρικών καλλιεργειών με κύτταρα τα οποία εκφράζουν συγκεκριμένα επιφανειακά αντιγόνα, όπως τα CD34⁺ κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, δεν αποκλείει την πιθανότητα να επηρεάζονται από το τεχνητό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται [199]. Επομένως, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στη λειτουργικότητα και στη διαφοροποίηση των EPCs. Εν κατακλείδι, προκύπτει ότι υπάρχει η ανάγκη να αναπτυχθεί μια ακριβής και ευκρινής μεθοδολογία χαρακτηρισμού των τριών κατηγοριών των EPCs. Μέχρι στιγμής όμως, στη βιβλιογραφία απαντώνται διάφοροι μέθοδοι χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης των καλλιεργημένων EPCs. Στην παρούσα μελέτη μας, ο γαρακτηρισμός των τριών κατηγοριών των EPCs (CFU-Hill, CACs, OECs) πραγματοποιήθηκε μέσω του οπτικού ανάστροφου μικροσκοπίου, της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και της μικροσκοπίας συνεστιασμού.

1. Χαρακτηρισμός των CFU-Hill κυττάρων

Στη μελέτη μας, όπως ήδη προαναφέρθηκε, τα CFU-Hill κύτταρα προήλθαν από την απομόνωση και στη συνέχεια καλλιέργεια των PB-MNCs σε πλακίδιο επικαλυμμένο με φιβρονεκτίνη. Όπως αναφέρεται και στη Μεθοδολογία, μετά από 2 μέρες καλλιέργειας έγινε συλλογή των μη προσκολλημένων κυττάρων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε νέα επιφάνεια καλλιέργειας όπου έχει επιστρωθεί φιβρονεκτίνη. Μετά από 7 μέρες

καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός χαρακτηριστικών αποικιών όπου υπάρχει το κεντρικό σύμπλεγμα κυττάρων με διάφορα επιμήκη κύτταρα στην περιφέρεια. Τα δεδομένα μας βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που έχουν γίνει [273, 289, 292, 443].

Επιπλέον, τα CFU-Hill κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την έκφραση τους σε διάφορα αντιγόνα. Τα CFU-Hill εκφράζουν CD34, ένδειξη η οποία συμφωνεί με μια μελέτη που έχει γίνει, όπου το 25,4% των κυττάρων ήταν θετικά στην έκφραση του συγκεκριμένου αντιγόνου [444]. Επιπλέον, τα CFU-Hill εκφράζουν KDR που είναι δείκτης των ECs [292, 444]. Επιπρόσθετα, τα CFU-Hill κύτταρα εμφανίζονται θετικά ως προς την έκφραση του CD45 που είναι ένα αντιγόνο εξειδικευμένο για τα αιμοποιητικά κύτταρα και του CD14 που είναι δείκτης των μονοκυττάρων. Τα αποτελέσματα μας βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου παρατηρείται η θετικότητα των CFU-Hill κυττάρων στα συγκεκριμένα αντιγόνα [292, 444, 445]. Επιπλέον, τα CFU-Hill κύτταρα εκφράζουν CD133 που υποδεικνύει τον πρόδρομο χαρακτήρα τους [313, 444]. Τέλος, τα CFU-Hill εκφράζουν σε μικρό ποσοστό CD31, υποδηλώνοντας παράλληλα τον ενδοθηλιακό τους φαινότυπο [313]. Εντούτοις, υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι τα CFU-Hill κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό την συγκεκριμένη πρωτεΐνη [292].

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των CFU-Hill με τη χρήση της μικροσκοπίας συνεστιασμού. Μετά την καλλιέργεια των CFU-Hill, ακολούθησε η χρώση τους με DiI-ac-LDL και FITC-lectin. Η DiI-ac-LDL είναι ακετυλιωμένη LDL επισημασμένη με τη χρωστική DiI (κόκκινο χρώμα). Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η συγκεκριμένη ιδιότητα αποδίδεται τόσο στα μακροφάγα όσο και στα κύτταρα με ενδοθηλιακό φαινότυπο [331, 446]. Γενικά, όταν τα EPCs σημαίνονται με DiI-ac-LDL, η λιποπρωτεΐνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα αυτά, αποικοδομείται από τα λυσοσωμικά ένζυμα και το φθοριόχρωμα DiI (κόκκινο χρώμα) συσσωρεύεται στις ενδοκυττάριες μεμβράνες. Έτσι, είναι σαφές ότι τα EPCs έχουν την ικανότητα πρόσληψης της DiI-ac-LDL μέσω ενδοκύτωσης. Από την άλλη, η FITC-λεκτίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη επισημασμένη με τη χρωστική FITC (πράσινο χρώμα), η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε γλυκοπρωτεΐνες και να προσκολλάται σε διάφορες κατηγορίες κυττάρων, όπως ECs, επιθηλιακά κύτταρα καθώς και άλλους τύπους κυττάρων που προέρχονται από το αίμα [447-449]. Συνεπώς το μειονέκτημα που προκύπτει είναι ότι, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναγνωριστεί εξειδικευμένα ένας

Συζήτηση

ενδοθηλιακός κυτταρικός φαινότυπος ή για να αποδειχθούν οι λειτουργικές ιδιότητες των πιθανών EPCs. Οπότε, μπορεί να ειπωθεί ότι ο χαρακτηρισμός των κυττάρων με την κυτταρομετρία ροής θεωρείται περισσότερο αξιόπιστος. Συγκεκριμένα, στη μελέτη μας βρέθηκε ότι, τα CFU-Hill εμφανίζουν την ικανότητα πρόσληψης της DiI-ac-LDL και δέσμευσης της FITC-λεκτίνης. Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνονται από πολλές μελέτες που έχουν διεξαχθεί [292, 313]. Τέλος, τα κύτταρα που εμφάνισαν φθορισμό τόσο για την DiI-ac-LDL όσο και για την FITC-lectin μπορούν να ταυτοποιηθούν γενικά ως EPCs, όπως άλλωστε έχει δειχθεί από διάφορες μελέτες [300, 450, 451].

2. Χαρακτηρισμός των CACs

Στην παρούσα διατριβή, όπως αναφέρθηκε, τα CACs κύτταρα προήλθαν από την απομόνωση και στη συνέχεια καλλιέργεια των PB-MNCs σε πλακίδιο επικαλυμμένο με φιβρονεκτίνη κάτω από συνθήκες ενδοθηλιακής διαφοροποίησης. Μετά από 4-7 μέρες καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μονήρων κυττάρων με σφαιρικό κυρίως σχήμα, ενώ ορισμένα κύτταρα ήταν ατρακτοειδή. Τα δεδομένα που προέκυψαν μετά από τον χαρακτηρισμό των CACs με το οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες [303, 452].

Τα CACs εκφράζουν κυρίως CD45 και CD14, όπου τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα [452-454]. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν μειωμένο ποσοστό κυττάρων θετικών στα δύο αντιγόνα [455, 456]. Επιπλέον, αυξημένο ποσοστό των CACs κυττάρων εκφράζει CD31 [452, 453, 455, 457] και KDR [452, 453]. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι μειωμένα ποσοστά των συγκεκριμένων κυττάρων εκφράζουν τα αντιγόνα CD31 [454] και KDR [454, 455, 457]. Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη μας, τα CACs κύτταρα δευτερευόντως εκφράζουν CD34 [452, 454-457] και CD133 [454, 455, 457].

Με τη μικροσκοπία συνεστιασμού τα CACs κύτταρα παρουσίασαν χρώση τόσο για την ac-LDL όσο και για την λεκτίνη. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί [452, 456]. Τέλος, παρατηρήθηκε χρώση των CACs με vWF, όπως έχει προκύψει και από άλλες μελέτες [452, 455]. Ο vWF είναι μια μεγάλη πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος, η οποία εκκρίνεται από τα ECs από τα σωματίδια Weibel Palade καθώς και από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Ο vWF δεσμεύεται σε διάφορα μόρια και κύτταρα. Στη μελέτη μας, ο vWF ήταν επισημασμένος με το φθοριόχρωμα FITC.

Συζήτηση

3. Χαρακτηρισμός των OECs

Σε επόμενο στάδιο της μελέτης μας, τα CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από CB-MNCs και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες ενδοθηλιακής διαφοροποίησης για 1 μήνα, οδηγώντας στη δημιουργία των OECs. Τα δεδομένα μας βρίσκονται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, όπου έχει βρεθεί ότι CD34⁺ κύτταρα προερχόμενα από το PB, τον BM ή τον CB όταν καλλιεργηθούν παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου και αυξητικών παραγόντων για χρονικό διάστημα 2-4 εβδομάδων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε OECs [209, 210, 458]. Παρατηρήθηκε ότι, τα CD34⁺ κύτταρα ήταν μικρά μονήρη με σφαιρικό σχήμα. Μετά από 1 μήνα καλλιέργειας και διαφοροποίησης των CD34⁺ κυττάρων προς OECs παρατηρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο η εμφάνιση κυττάρων με ελλειψοειδή μορφολογία και ατρακτοειδές σχήμα τα οποία είχαν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης. Οι παρατηρήσεις που έγιναν συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα από διάφορες μελέτες [323, 434, 459]. Τέλος, στα πειράματα μας παρακολουθήθηκε η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων μετά από 10 και 15 μέρες καλλιέργειας. Διαπιστώθηκε ότι, οι εικόνες των κυττάρων που προέκυψαν ήταν σχεδόν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν σε μια μελέτη όπου παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση των CD34⁺ μετά από 7 και 21 μέρες καλλιέργειας [460].

Τα CD34⁺ όπως είναι φυσιολογικό, βρέθηκε να έχουν υψηλή έκφραση CD34. Στη συνέχεια, τα OECs κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία χαρακτηρισμού ήταν 1^{ης} και 4^{ης} ανακαλλιέργειας. Διαπιστώθηκε ότι, τα OECs 1^{ης} γενιάς εκφράζουν CD34, KDR, CD31 και σε μικρό ποσοστό CD133, ενώ αντίθετα διαπιστώνεται μηδενική έκφραση του αντιγόνου CD45. Επιπλέον, τα OECs 4^{ης} ανακαλλιέργειας παρατηρήθηκε ότι εκφράζουν CD34, KDR και CD31, ενώ αντίθετα προέκυψε ελάχιστη ή μηδαμινή έκφραση των αντιγόνων CD45 και CD133. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση του CD14 στα OECs 4^{ης} γενιάς. Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα μας ανεξαρτήτως της γενιάς των OECs βρίσκονται σε συμφωνία με αρκετές μελέτες [323, 434, 459, 461, 462]. Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές ανακαλλιέργειες μεταξύ τους, διαπιστώθηκε ότι, τα OECs 4^{ης} ανακαλλιέργειας είχαν ελάχιστα μειωμένη έκφραση του CD34, στη αντιγόνου CD31 σε σύγκριση με τα OECs 1^{ης} γενιάς. Τα παραπάνω αποτελέσματα ιο βαθμός της

Συζήτηση

ανακαλλιέργειας μειώνεται σε σημαντικό ποσοστό η μικρή έκφραση του αντιγόνου CD133, που δείχνει τον πρόδρομο χαρακτήρα των κυττάρων. Επιπλέον, ο ενδοθηλιακός χαρακτήρας των OECs αυξάνεται σημαντικά, συμπέρασμα το οποίο προκύπτει από την αυξημένη έκφραση του CD31. Συνεπώς, τα OECs 4^{ης} γενιάς ουσιαστικά αποκτούν έναν αυξημένο ενδοθηλιακό φαινότυπο σε σύγκριση με τα OECs 1^{ης} γενιάς τα οποία προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των απομονωμένων CD34⁺ κυττάρων. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Wang και τους συνεργάτες του, παρατηρήθηκε αυξημένη θετικότητα ως προς την έκφραση των CD31 και KDR στα OECs 3^{ης} ως 5^{ης} ανακαλλιέργειας σε σύγκριση τόσο με τα κύτταρα 2^{ης} όσο και με τα κύτταρα μεγαλύτερης από την 5^η γενιάς [323]. Τα δεδομένα συμφωνούν με τα αποτελέσματα της διατριβής μας, όπου παρατηρείται αυξημένο ποσοστό κυττάρων θετικών στο CD31 και KDR στα OECs 4^η γενιάς συγκριτικά με τα κύτταρα 1^{ης} γενιάς. Τέλος, στη συγκεκριμένη μελέτη που έγινε, διαπιστώθηκε ότι τα OECs 3^{ης} ως 5^{ης} ανακαλλιέργειας συσχετίζονται με αυξημένη καθαρότητα και βελτιωμένη λειτουργικότητα συγκριτικά με τις μεγαλύτερες γενιές [323]. Συνολικά, μπορεί να ειπωθεί ότι, παρατηρείται η συνεχής ενίσχυση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου καθώς μεταβαίνουμε από τα CD34⁺ κύτταρα στα OECs $1^{\eta\varsigma}$ και τέλος στα OECs $4^{\eta\varsigma}$ γενιάς.

Χρησιμοποιώντας τη μικροσκοπία συνεστιασμού, τα OECs κύτταρα παρουσίασαν χρώση τόσο για την ac-LDL όσο και για την λεκτίνη. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με άλλα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία [303, 434]. Τέλος, παρατηρήθηκε χρώση των OECs με vWF, όπως έχει προκύψει και από άλλες μελέτες [323, 463].

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι, τα CFU-Hill και τα CACs κύτταρα που ονομάζονται αλλιώς early EPCs μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, όπως η έκφραση των CD45 και CD14, υποδηλώνοντας με αυτόν τρόπο την αιμοποιητική και μονοκυτταρική φύση των κυττάρων, η προέλευση των οποίων πιθανόν συσχετίζεται με αυτή των HSCs. Αντίθετα, τα OECs ή late EPCs δεν είναι αιμοποιητικά κύτταρα και εμφανίζουν έναν ενδοθηλιακό φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των HUVECs. Τα συγκεκριμένα ευρήματα συμφωνούν με πρόσφατες μελέτες που δείχνουν με τη χρήση μοριακής ανάλυσης ότι τα early EPCs παρουσιάζουν παρόμοιο πρωτεϊνικό προφίλ σε μεγάλο ποσοστό με αυτό των μονοκυττάρων, ενώ τα late EPCs εμφανίζουν αντίστοιχο προφίλ με αυτό των ώριμων ECs, όπως των HUVECs [251, 309, 435].

Στην παρούσα έρευνα, θελήσαμε να εξετάσουμε κατά πόσο τα ίδια τα κύτταρα και το υπερκείμενό τους μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

παρουσία διαφόρων αγωνιστών. Ο σκοπός είναι η μελλοντική τους αξιοποίηση ως μια εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση στον ερευνητικό τομέα της αρτηριακής θρόμβωσης.

Επίδραση των διαφόρων τύπων των EPCs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με συσσωρευομετρία

Αφού έγινε χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των διαφόρων κατηγοριών των EPCs, στη συνέχεια θελήσαμε να ερευνήσουμε την πιθανή ανασταλτική δράση τόσο των κυττάρων όσο και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα CD34⁺ κύτταρα και τα HUVECs. Πραγματοποιήθηκαν επωάσεις των δειγμάτων μας με τα αιμοπετάλια σε διάφορες χρονικές στιγμές, ενώ οι αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ήταν το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το Trap14 που είναι ανάλογο της θρομβίνης. Σε όλα τα πειράματα, ως control χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων.

1. Επίδραση των CFU-Hill κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Διαπιστώθηκε ότι τα CFU-Hill κύτταρα, καθώς και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης. Είναι γνωστό ότι, τα CFU-Hill μπορούν να εκκρίνουν διάφορους προαγγειογόνους παράγοντες στο υπερκείμενο, όπως είναι ο VEGF και η IL-8 [203, 464]. Εντούτοις, δεν έχει βρεθεί ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν σε σημαντικό ποσοστό αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες, όπως είναι το NO και η PGI₂. Πράγματι, σε μελέτη που έχει γίνει, υποστηρίζεται ότι τα CFU-Hill είναι αιμοποιητικής φύσης κύτταρα και εκφράζουν ελάχιστα eNOS [445]. Είναι γνωστό ότι, το eNOS παράγει το αγγειοπροστατευτικό μόριο NO, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση των αγγείων. Το NO των αγγείων διεγείρει τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση η οποία οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) και στη χαλάρωση των SMCs. Επιπλέον, το NO αναστέλλει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, όπως επίσης και τις διαδικασίες της συσσώρευσης και της προσκόλλησης [465]. Τέλος, τα CFU-Hill κύτταρα λόγω της

αιμοποιητικής και της μονοκυτταρικής τους φύσης είναι φυσιολογικό να μην έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

2. Επίδραση των CACs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Διαπιστώθηκε ότι τα CACs κύτταρα, καθώς και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14. Παρομοίως με τα CFU-Hill κύτταρα, τα CACs κύτταρα είναι αιμοποιητικής/μονοκυτταρικής φύσης και εκκρίνουν διάφορους προαγγειογόνους παράγοντες, όπως VEGF. IL-8 [299]. Σε μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός, η πρωτεΐνη eNOS δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Επιπλέον, η καβεολίνη-1 μια πρωτεΐνη που είναι σημαντικός ρυθμιστής της eNOS στα ώριμα ECs ανιχνεύτηκε ελάχιστα στα CACs [303]. Τέλος, τα CACs κύτταρα δεν εμφανίζουν αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Συμπερασματικά, τα early EPCs δεν εκφράζουν ση μεμβράνη τους ή εκκρίνουν στο υπερκείμενο τους αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες. Εντούτοις, τόσο τα CFU-Hill όσο και τα CACs κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν στην αγγειογένεση έμμεσα εκκρίνοντας αγγειογόνους παράγοντες και φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποδόμηση του γειτονικού ιστού, επιτρέποντας έτσι το σχηματισμό νέων αγγείων [299].

3. Επίδραση των OECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Τα OECs κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πιθανή αναστολή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν 1^{ης} ως 4^{ης} γενιάς. Προέκυψε ότι, τόσο τα OECs κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους παρουσίασαν αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, παρουσία είτε του κολλαγόνου είτε του Trap14. Παρατηρήθηκε ότι, όσο αυξάνεται η γενιά των OECs κυττάρων, τόσο πιο αυξημένη είναι η ανασταλτική τους δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το συγκεκριμένο εύρημα συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής όπου τα κύτταρα αυξημένης ανακαλλιέργειας παρουσίασαν βελτιωμένο ενδοθηλιακό φαινότυπο. Τα OECs κύτταρα ανέστειλαν με δοσο- και χρονοεξαρτώμενο τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Έχει βρεθεί ότι τα OECs κύτταρα, σε αντίθεση με τα early EPCs

παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση eNOS και εκκρίνουν διάφορες αγγειοδραστικές ουσίες στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξής τους, όπως NO, την PGI2, τον ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (t-PA) και τον VEGF. Οι ουσίες NO, PGI2 όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι ισχυροί αναστολείς της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Είναι γνωστό ότι, το NO είναι σημαντικός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του ενδοθηλίου ενώ η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του ΝΟ που προέρχεται από το ενδοθήλιο συσχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και είναι ένας ανεξάρτητος δείκτης μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων [465]. Η PGI₂ συνοπτικά παρεμποδίζει το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [466]. Συνεπώς, το υπερκείμενο των OECs αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων επειδή τα OECs κύτταρα όπως και τα ώριμα ECs εκκρίνουν ουσίες με αντιαιμοπεταλιακή δράση. Όπως αναφέρθηκε, η μοριακή ανάλυση των OECs έχει δείξει ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα HUVECs. Επομένως, τόσο τα OECs κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων πιθανώς λόγω της έκφρασης ενδοθηλιακού φαινοτύπου. Συμπερασματικά, για πρώτη φορά αναδείχθηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση των OECs και του υπερκειμένου τους.

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα είναι ότι, τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους αναστέλλουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο. Το παραπάνω φαινόμενο ισχύει και για τα HUVECs κύτταρα. Ο λόγος για τον οποίο ενδεχομένως μπορεί να ισχύει αυτό είναι γιατί τα EPCs και ιδιαίτερα τα late EPCs εκφράζουν τον PAR-1 υποδοχέα [210]. Η θρομβίνη και το δομικό της ανάλογο Trap14 ενεργοποιεί τον PAR-1 υποδοχέα των OECs κυττάρων προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξαρτώμενη από τον CXCR4 μετανάστευση και διαφοροποίησή τους [210]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στα πειράματα συσσωρευομετρίας που έγιναν χρησιμοποιήθηκε θρομβίνη συγκέντρωσης 0,1 U/ml ενώ η επώαση των κυττάρων με τον αγωνιστή ήταν 5 min. Είναι γνωστό από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, ότι η θρομβίνη ενεργοποιεί τα HUVECs, καθώς και τα EPCs και συσγκεκριμένα τα late EPCs [210, 460, 467]. Έτσι, θελήσαμε να διευκρινίσουμε κατά πόσο υπάρχει δράση στα ίδια τα κύτταρα από τη θρομβίνη. Στις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, χρησιμοποιήθηκε συνήθως θρομβίνη συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 1 U/ml ενώ η επώαση ήταν μεγαλύτερη από 5 min [468-470]. Συμπερασματικά, η θρομβίνη καθώς και

Συζήτηση

το Trap14 που είναι δομικό ανάλογο της θρομβίνης δεν επάγουν την ενεργοποίηση των EPCs και των HUVECs.

Τα HUVECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους παρουσίασαν ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή του Trap14. Αντίθετα, τα CD34⁺ κύτταρα και το υπερκείμενό τους δεν εμφάνισαν καθόλου αναστολή στη συσσώρευση. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας, προέκυψε ότι μόνο τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους παρουσίασαν αναστολή στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων εμφανίζοντας ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Για αυτό το λόγο, θελήσαμε να εμβαθύνουμε περισσότερο μελετώντας την πιθανή επίδραση των συγκεκριμένων κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρίας ροής.

Επίδραση των OECs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής

Στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκαν το CD61 ως αιμοπεταλιακός δείκτης, το PAC-1 για την εκτίμηση της μεμβρανικής έκφρασης του υποδοχέα-ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃, το CD62P για τον υπολογισμό της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης, το CD31 ως ενδοθηλιακός δείκτης και τέλος το CD34 που ταυτοποιεί τα EPCs. Μελετήθηκε η επίδραση των OECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των ελεύθερων και των προσκολλημένων στα κύτταρα αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας ως αγωνιστή το ADP. Αργικά, εξετάστηκε η επίδραση των κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που δεν είναι προσκολλημένα στα κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια τόσο παρουσία των OECs κυττάρων όσο και του υπερκειμένου τους παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του PAC-1 και του CD62P σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των OECs και του υπερκειμένου τους. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία των κυττάρων μας εμφάνισαν μειωμένα ποσοστά διπλοθετικών PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 κυττάρων (εκφρασμένα ως % Gated) σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία των OECs και των υπερκειμένων τους. Τα HUVECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους παρουσίασαν παρόμοια ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των

Συζήτηση

αιμοπεταλίων. Αντίθετα, τα CD34⁺ κύτταρα δεν ανέστειλαν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Στην περίπτωση των αιμοπεταλίων που είναι προσκολλημένα στα κύτταρα χρησιμοποιούνται μόνο τα OECs, τα CD34⁺ και τα HUVECs κύτταρα και όχι το υπερκείμενό τους. Αρχικά υπολογίστηκε το ποσοστό των OECs και HUVECs κυττάρων που ήταν διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD31 και του CD61. Στη συνέχεια, στην επιλεγμένη περιοχή παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα OECs (εκφρασμένη ως % CD31⁺/CD61⁺) ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Εντούτοις, οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένα προσκολλημένα αιμοπετάλια ήταν παρόμοιοι με αυτούς των μη ενεργοποιημένων προσκολλημένων αιμοπεταλίων. Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει ότι υπάρχει αναστολή της ενεργοποίησης των προσκολλημένων αιμοπεταλίων από τα OECs κύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκαν τα HUVECs κύτταρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα OECs ουσιαστικά είναι κύτταρα που εκφράζουν ισχυρό ενδοθηλιακό φαινότυπο. Τέλος, στην περίπτωση των CD34⁺ κυττάρων, υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν διπλοθετικά ως προς την έκφραση του CD34 και του CD61. Στη συνέχεια, στην επιλεγμένη περιοχή παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα CD34⁺ κύτταρα (εκφρασμένη ως % CD34⁺/CD61⁺) ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Οι λόγοι των τιμών της μέσης έντασης φθορισμού των PAC-1/CD61 και CD62P/CD61 στα ενεργοποιημένα προσκολλημένα αιμοπετάλια ήταν αυξημένοι σε σύγκριση με αυτούς των μη ενεργοποιημένων προσκολλημένων αιμοπεταλίων. Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει ότι δεν παρατηρείται αναστολή της ενεργοποίησης των προσκολλημένων αιμοπεταλίων από τα CD34⁺ κύτταρα.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό μέσω του οποίου γίνεται η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα κύτταρα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Όπως αναφέρεται και στην Εισαγωγή, η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο πραγματοποιείται μέσω του γλυκοπρωτεϊνικού προσδέτη της P-σελεκτίνης (PSGL-1) των αιμοπεταλίων και της ενδοθηλιακής P-σελεκτίνης. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα OECs ενεργοποιεί τα συγκεκριμένα κύτταρα με αποτέλεσμα την έκφραση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης. Στα πειράματα μας δεν παρατηρείται αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων. Το

Συζήτηση

μονοκλωνικό αντίσωμα PAC-1-FITC αναγνωρίζει την ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα της ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃ (γλυκοπρωτεΐνη IIbIIIa). Στα πειράματα μας όπου δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του υποδοχέα α_{IIb}β₃, σημαίνει ότι ο υποδοχέας δεν αλλάζει διαμόρφωση. Συνεπώς, δεν μπορούν να δημιουργηθούν γέφυρες ινωδογόνου μεταξύ των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να μην υπάρξει συσσώρευση.

Τέλος, θελήσαμε να δούμε αν το ADP που χρησιμοποιήθηκε στην κυτταρομετρία ενεργοποιεί τα OECs κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, το ADP ενεργοποιεί τους υποδοχείς P2Y1, P2Y12 και P2Y13 [471-473]. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα EPCs και συγκεκριμένα τα OECs εκφράζουν πουρινεργικούς P2Y υποδοχείς. Όσον αφορά τα HUVECs, αυτά εκφράζουν διάφορους πουρινεργικούς υποδοχείς όπως P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 και P2Y11, αλλά όχι τον P2Y12 [471, 474].

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι, τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους εμφάνισαν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση, όπως αυτή φαίνεται από τη συσσωρευομετρία και την κυτταρομετρία, πιθανώς λόγω της έκφρασης ισχυρού ενδοθηλιακού φαινοτύπου που είναι παρόμοιος με αυτόν των HUVECs. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι τα OECs αυξημένης γενιάς εκφράζουν αυξημένο βαθμό ενδοθηλιακού φαινοτύπου ο οποίος συσχετίζεται με μεγαλύτερο ποσοστό αντιαιμοπεταλιακής δράσης. Τέλος, ένα πολύ σημαντικό πρωτότυπο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι, τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους αναστέλλουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο. Η σπουδαιότητα των παραπάνω ευρημάτων στους μηχανισμούς της αθηρωμάτωσης παραμένουν υπό διερεύνηση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (EPCs) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

Βασίλειος Γ. Χαντζηχρήστος

Διδακτορική Διατριβή Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Είναι γνωστό ότι, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση, στη φλεγμονή και στην αγγειογένεση. Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs) είναι ένας πληθυσμός πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs). Τα EPCs συνεισφέρουν σε σημαντικό βαθμό στην αναγέννηση του αγγειακού ενδοθηλίου και στην επανενδοθηλιοποίηση. Επιπρόσθετα, εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα αντιγόνα CD34, CD133 και KDR. Τα CD34 και CD133 είναι δείκτες πρόδρομων κυττάρων, ενώ το KDR ταυτοποιεί τα κύτταρα με ενδοθηλιακό φαινότυπο. Συνεπώς, ο ορισμός των EPCs είναι σύνθετος εξαιτίας της απουσίας ενός μοναδικού εξειδικευμένου δείκτη. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι, στη διεθνή επιστημονική κοινότητα δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη μια εξειδικευμένη και ευαίσθητη μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των EPCs. Εντούτοις, διάφορες κατηγορίες των κυκλοφορούντων EPCs έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης και καλλιέργειας. Τα EPCs ταξινομούνται στα colony forming unit-Hill (CFU-Hill) κύτταρα και τα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs), τα οποία ονομάζονται early EPCs, όπως επίσης και στα προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs) ή late EPCs. Στην παρούσα μελέτη, θελήσαμε να αναπτύξουμε μεθόδους απομόνωσης και καλλιέργειας των διαφόρων τύπων EPCs για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση των EPCs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, in vitro.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καλλιέργεια των μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες έτσι ώστε να οδηγηθούμε στη δημιουργία των CFU-Hill και CACs κυττάρων. CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από μονοπύρηνα κύτταρα αίματος από ομφάλιο λώρο και καλλιεργήθηκαν κατάλληλα για 30 μέρες ώστε να οδηγηθούμε στο σχηματισμό των OECs κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των τριών κατηγοριών $\tau \omega v \quad EPCs$ χρησιμοποιώντας το οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο, την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και τη μικροσκοπία συνεστιασμού. Βρέθηκε ότι, τα CFU-Hill κύτταρα είχαν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών που αποτελούνταν από ένα κεντρικό σύμπλεγμα σφαιρικών κυττάρων με επιμήκη κύτταρα στην περιφέρεια. Τα CACs ήταν σφαιρικά κύτταρα ενώ μερικά από αυτά ήταν ατρακτοειδή. Τα OECs μοιάζουν ως προς τη μορφολογία με τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου (HUVECs) αφού αυτά εμφανίζουν μια τυπική ελλειψοειδή μορφή και παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης. Τέλος, τα CD34⁺ κύτταρα ήταν μικρά με σφαιρικό σχήμα. Στη συνέγεια, πραγματοποιήσαμε το χαρακτηρισμό των τριών κατηγοριών των EPCs ως προς την έκφραση διαφόρων επιφανειακών αντιγόνων. Τα CFU-Hill κύτταρα παρουσίασαν έκφραση των CD34, KDR και CD133. Επιπλέον, εμφάνισαν έκφραση του γενικού δείκτη των λευκοκυττάρων CD45 και του μονοκυτταρικού δείκτη CD14, υποδεικνύοντας την αιμοποιητική τους φύση. Τέλος, βρέθηκε ότι εκφράζουν CD31, ένα εξειδικευμένο ενδοθηλιακό αντιγόνο. Παρομοίως, τα CACs παρουσίασαν έκφραση των CD34, KDR, CD133, CD31, όπως επίσης των CD45 και CD14, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά εμφανίζουν αιμοποιητικά χαρακτηριστικά. Γενικά, βρέθηκε ότι τα OECs εκφράζουν CD34, KDR, CD31 και μόνο ένα μικρό ποσοστό τον πρόδρομο δείκτη CD133. Από την άλλη πλευρά, τα OECs δεν παρουσίασαν καθόλου έκφραση των αιμοποιητικών δεικτών CD14 και CD45, δείχνοντας ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν ισχυρό ενδοθηλιακό φαινότυπο. Ένα σημαντικό εύρημα είναι ότι, ο ενδοθηλιακός φαινότυπος των OECs φαίνεται να είναι ισχυρότερος καθώς αυξάνεται η γενιά των κυττάρων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των EPCs με μικροσκοπία συνεστιασμού. Τα CFU-Hill είχαν την ικανότητα πρόσληψης της Dil-ακετυλιωμένης LDL (Dil-ac-LDL) και δέσμευσης της FITC-λεκτίνης. Επίσης, έγινε χρώση των CACs με τον παράγοντα von Willebrand (vWF). Ακολούθησε χρώση των OECs με την ac-LDL, τη λεκτίνη και τον vWF.

Αφού πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των EPCs, η επίδραση των κυττάρων και του υπερκειμένου τους στη συσσώρευση των πλυμένων

Περίληψη

αιμοπεταλίων μελετήθηκε με τη συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας. Μελετήθηκαν επίσης τα CD34⁺ και τα HUVECs κύτταρα, καθώς και το υπερκείμενό τους. Ως αγωνιστές των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το Trap14. Τόσο τα CFU-Hill κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ή της θρομβίνης. Παρομοίως, τα CACs κύτταρα και το υπερκείμενό τους δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση στη συσσώρευση η οποία προκλήθηκε από το κολλαγόνο ή το Trap14. Από την άλλη πλευρά, τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο ή το Trap14. Η ανασταλτική δράση των OECs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν παρόμοια με αυτή των HUVECs, αφού τα OECs εκφράζουν ισχυρό ενδοθηλιακό φαινότυπο. Η ανασταλτική δράση που εμφανίζει το υπερκείμενο των OECs πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι τα OECs κύτταρα, σε αντίθεση με τα early EPCs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (eNOS) και εκκρίνουν διάφορες αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες, όπως μονοξείδιο του αζώτου (NO) και προσταγλανδίνη I₂ (PGI₂). Ο αυξανόμενος βαθμός του ενδοθηλιακού φαινοτύπου βρέθηκε να συσχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό αντιαιμοπεταλιακής δράσης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα OECs κύτταρα. Τέλος, ένα πολύ σημαντικό πρωτότυπο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι τα OECs κύτταρα, καθώς και το υπερκείμενό τους παρουσίασαν αυξημένη αναστολή από το Trap14 παρά από το κολλαγόνο. Ο λόγος για τον οποίο ενδεχομένως μπορεί να ισχύει αυτό είναι γιατί τα EPCs και ιδιαίτερα τα late EPCs εκφράζουν τον PAR-1. Τόσο τα CD34⁺ κύτταρα όσο και το υπερκείμενό τους δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη. Συμπερασματικά, μόνο τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους ανέστειλαν τη συσσώρευση εμφανίζοντας ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Για αυτό το λόγο, θελήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω την επίδραση των συγκεκριμένων κυττάρων και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής.

Στη συνέχεια, ερευνήθηκε η επίδραση των OECs και του υπερκειμένου τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τον αγωνιστή ADP. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας τη μεμβρανική έκφραση του υποδοχέαιντεγκρίνης α_{IIb}β₃ (πρόσδεση PAC-1-FITC) και τη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης (CD62P-PE). Έγινε χρώση των αιμοπεταλίων με τον αιμοπεταλιακό δείκτη CD61-PerCP

και των OECs με τον ενδοθηλιακό δείκτη CD31-PE. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των HUVECs κυττάρων και του υπερκειμένου τους, καθώς επίσης και των CD34⁺ κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Βρέθηκε ότι, τα ελεύθερα αιμοπετάλια τα οποία δεν είναι προσκολλημένα στα CD34⁺, OECs και HUVECs κύτταρα ενεργοποιούνται. Τα OECs, καθώς και τα HUVECs κύτταρα και τα υπερκείμενά τους ανέστειλαν την ενεργοποίηση των ελεύθερων αιμοπεταλίων. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP επάγει την προσκόλλημένα στα OECs, στα CD34⁺ και στα HUVECs κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι, τα προσκολλημένα αιμοπετάλια είτε στα OECs είτε στα HUVECs κύτταρα δεν ενεργοποιούνται. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στα CD34⁺ κύτταρα.

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα OECs κύτταρα και το υπερκείμενό τους εμφανίζουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η σπουδαιότητα των παραπάνω ευρημάτων στους μηχανισμούς της αθηρωμάτωσης παραμένουν υπό διερεύνηση.

ABSTRACT

STUDY OF THE ROLE OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (EPCs) IN ATHEROMATOUS DISEASE

Vasileios G. Chantzichristos

Doctoral Dissertation Department of Chemistry, University of Ioannina

It is known that, platelets play a major role in hemostasis, inflammation and angiogenesis. Endothelial progenitor cells (EPCs) are a population of pluripotent stem cells which have the ability to differentiate into mature endothelial cells (ECs). EPCs contribute significantly in the regeneration of the vascular endothelium and neovascularization. Furthermore, they express surface antigens CD34, CD133 and KDR. CD34 and CD133 are markers of progenitor cells, whereas KDR identifies cells with endothelial phenotype. Consequently, the definition of EPCs is complex due to the absence of a unique specific cell marker. Furthermore, a specific and sensitive method for the characterization and identification of EPCs has not yet been developed in the international scientific community. However, several types of circulating EPCs, depending on the method of isolation and culture, have been described in bibliography. These include colony forming unit-Hill (CFU-Hill) cells, and circulating angiogenic cells (CACs) which are called early EPCs, as well as late-outgrowth endothelial progenitor cells (OECs) that are late EPCs. In the present study, we initially developed methods for the isolation and culture of EPC populations for the first time in our laboratory. Then, we wanted to investigate the potential effect of the above types of EPCs on platelet activation in vitro.

Initially, peripheral blood mononuclear cells were isolated and cultured under different conditions to lead to the formation of CFU-Hill and CACs cells. Moreover, CD34⁺ cells were isolated from cord blood mononuclear cells and appropriately cultured

for 30-days for differentiation into OECs. Then, we performed characterization and identification of the above types of EPCs using light inverted microscope, flow cytometry, and finally confocal microscopy. It was found that, CFU-Hill cells formed colonies with a defined central cluster of round cells and elongated spindle-like cells in the periphery. CACs were rounded cells whereas some of them acquired spindle-shaped morphology. OECs better resemble mature endothelial cells from umbilical cord (HUVECs) since they display typical cobblestone morphology and they have high proliferative capacity. Finally, $CD34^+$ cells appeared to be small with round shape. Next, we performed the characterization of the three types of EPCs for the expression of cell surface antigens. CFU-Hill cells expressed CD34, KDR, CD133. Moreover, they expressed the panleukocyte marker CD45 and the monocyte marker CD14, indicating their hematopoietic nature. Finally, they expressed CD31, a specific endothelial antigen. Similarly, CACs expressed CD34, KDR, CD133, CD31 including CD45 and CD14, suggesting that these cells exhibit haematopoietic characteristics. In general, OECs showed expression of CD34, KDR, CD31 and only a small percentage expressed the immature marker CD133. On the other hand, OECs did not express at all the hematopoietic markers CD14 and CD45, showing that these cells exhibit strong endothelial phenotype. An important finding is that, the endothelial phenotype of OECs appears to be much stronger as cell passage is increased. Finally, we characterized EPCs performing experiments with confocal microscopy. CFU-Hill were found positive for DiI-acetylated LDL (DiI-ac-LDL) uptake and FITC-lectin binding. CACs stained positive with both ac-LDL and lectin. Furthermore, CACs stained with von Willebrand factor (vWF). Similarly, OECs stained with ac-LDL, lectin, and vWF.

Since we performed the characterization and identification of EPCs, the effect of those cells and their supernatant on washed platelet aggregation was studied with the light transmittance aggregometry method. CD34⁺ and HUVECs cells and their supernatant were also studied. Collagen, thrombin and trap14 were used as platelet aggregation in the CFU-Hill cells and their supernatant did not inhibit platelet aggregation in the presence of collagen or thrombin. Similarly, CACs cells and their supernatant did not exhibit any inhibitory activity on platelet aggregation induced by collagen or Trap14. On the other hand, OECs cells and their supernatant inhibited platelet aggregation induced by collagen or Trap14. The inhibitory effect of OECs on platelet aggregation was similar to that induced by HUVECs, since OECs express strong endothelial phenotype. It was found that,

OECs cells, unlike early EPCs exhibit increased expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and secrete various antiplatelet factors, such as nitric oxide (NO) and prostaglandin I_2 (PGI₂). Therefore, the supernatant of OECs is able to inhibit platelet aggregation. The increased degree of endothelial phenotype was found to be associated with higher percentage of antiplatelet activity. Furthermore, OECs cells inhibited platelet aggregation in a dose- and time-dependent manner. Finally, a very important original finding of this study is that the OECs cells and their supernatant exhibited higher inhibition on washed platelet aggregation in the presence of Trap14 compared to collagen. This phenomenon may be due to the fact that EPCs and particularly late EPCs express PAR-1 receptor. Both CD34⁺ cells and their supernatant did not inhibit platelet aggregation by thrombin. Conclusively, only OECs cells and their supernatant showed inhibition of platelet aggregation displaying strong antiplatelet activity. Therefore, we wanted to study further the effect of OECs and their supernatant on platelet activation using flow cytometry.

We studied the effect of OECs and their supernatant on platelet activation induced by agonist ADP. Platelet activation was evaluated by determining the integrin-receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ membrane expression (PAC-1-FITC binding) and P-selectin membrane expression (CD62P-PE). Platelets were stained with platelet marker CD61-PerCP and OECs with endothelial marker CD31-PE. The effect of HUVECs cells and their supernatant, as well as CD34⁺ cells on platelet activation was also studied. It was found that, platelets that are not attached to CD34⁺, OECs and HUVECs cells, are activated. OECs and HUVECs cells, as well as their supernatant inhibited non-adherent platelet activation. On the contrary, CD34⁺ cells and their supernatant did not inhibit non-adherent platelet activation. Platelet activation with ADP induces platelet adherence to OECs, CD34⁺ and HUVECs cells. It was observed that, platelets that are adherent either to OECs or to HUVECs cells are not activated. The above phenomenon was not noticed in CD34⁺ cells.

In summary, the present study shows for the first time that OECs cells and their supernatant exhibit potent antiplatelet activity. The importance of the above findings on the mechanisms of atheromatosis remain under investigation.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**: p. 1531-1539.
- 2. Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E., McGlove, P., *Hematology: Basic principles and practice*. Churchill and Livingstone, 2000.
- 3. Cimmino, G., Golino, P., *Platelet biology and receptor pathways*. J Cardiovasc Trans Res., 2013. **6**: p. 299-309.
- 4. Machlus, K.R., Italiano, J.E., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation.* J Cell Biol., 2013. **201**(6): p. 785-796.
- 5. Jenne, C.N., Urrutia, R., Kubes, P., *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity.* Int. Jnl. Lab. Hem., 2013. **35**: p. 254-261.
- 6. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Blood, 1995. **86**: p. 419–431.
- 7. Nakeff, A., Maat, B., Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. Blood, 1974. **43**: p. 591–595.
- 8. Thon, J.N., Italiano, J.E., *Platelets: Production, morphology and ultrastructure.* Antiplatelet agents. Handbook of Experimental Pharmacology, 2012. **210**: p. 3-22.
- 9. Avanzi, M.P., Mitchell, W.B., *Ex vivo production of platelets from stem cells*. Br J Haematol., 2014.
- 10. White, J., Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W., *Basic principles and clinical practice. Anatomy and structural organization of the platelet.* Hemostasis and Thrombosis, 1994.
- 11. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med., 2002. 8: p. 1227-1234.
- 12. Ni, H., Freedman, J., *Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands.* Transfus Apher Sci., 2003. **28**: p. 257-264.
- 13. Rendu, F., Brohard, B.B., *The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions.* Platelets, 2001. **12**: p. 261–273.
- 14. White, J.G., *The substructure of human platelet microtubules*. Blood, 1968: p. 638-648.
- 15. White, J.G., Clawson, C.C., *Overview article: biostructure of blood platelets*. Ultrastruct Pathol., 1980. **1**: p. 538-558.
- 16. Coller, B.S., *Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation*. Ann NY Acad Sci., 1983. **416**: p. 693-708.
- 17. Behnke, O., *The morphology of blood platelet membrane systems*. Ser Haematol., 1970. **3**: p. 3-16.
- 18. Sixma, J.J., Lips, P.M., *Isolation of platelet membranes. A review.* Thromb Haemost., 1978. **39**: p. 328-337.

- 19. Coller, B.S., *The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy.* Eur Heart J., 1995. **16**: p. 11-15.
- 20. Singer, S.J., Nicolson, G.L., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-731.
- 21. Τσελέπης, Α.Δ., Τσουκάτος, Δ.Κ., *Στοιχεία Φυσιολογίας του ανθρώπου* Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1997.
- 22. Schick, P.K., Kurica, K.B., Chacko, G.K., *Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane*. J Clin Invest., 1976. **57**: p. 1221-1226.
- 23. Bevers, E.M., Comfurius, P., Zwaal, R.F., *Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation*. Biochim Biophys Acta, 1983. **736**: p. 57-66.
- 24. Comfurius, P., Senden, J.M., Tilly, R.H., Schroit, A.J., Bevers, E.M., Zwaal, R.F., Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. Biochim Biophys Acta, 1990. **1026**: p. 153-160.
- 25. Heemskerk, J.W., Bevers, E.M., Lindhout, T., *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost., 2002. **88**: p. 186-193.
- 26. Ginsberg, M.H., Xiaoping, D., O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Plow, E.F., *Platelet integrins*. Thromb Haemost., 1993. **70**: p. 87-93.
- 27. van Gils, J.M., Zwaginga, J.J., Hordijk, P.L., Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. J Leukoc Biol., 2009. **85**: p. 195-204.
- 28. Ruggeri, Z.M., Mendolicchio, G.L., *Adhesion mechanisms in platelet function*. Circ Res., 2007. **100**: p. 1673-1685.
- 29. Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W.M., Levi, M., Reitsma, P.H., *New fundamentals in hemostasis.* Physiol Rev. , 2013. **93**: p. 327-358.
- 30. Pollard, T.D., Actin. Curr Opin Cell Biol., 1990. 2: p. 33-40.
- 31. Koseoglu, S., Flaumenhaft, R., *Advances in platelet granule biology*. Curr Opin Hematol., 2013. **20**: p. 464-471.
- 32. Flaumenhaft, R., *Molecular basis of platelet granule secretion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2003. **23**: p. 1152-1160.
- 33. Sixma, J.J., Slot, J.W., Geuze, H.J., *Immunocytochemical localization of platelet granule proteins*. Methods Enzymol., 1989. **169**: p. 301-311.
- 34. Harrison, P., Savidge, G.F., Cramer, E.M., *The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins*. Br J Haematol., 1990. **74**: p. 125-130.
- 35. Jones, O.P., Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. Anat Rec., 1960. **138**: p. 105-113.
- 36. Troxler, M., Dickinson, K., Homer-Vanniasinkam, S., *Platelet function and antiplatelet therapy*. Br J Surg., 2007. **94**: p. 674-682.

- 37. Suzuki, H., Nakamura, S., Itoh, Y., Tanaka, T., Yamazaki, H., Tanoue, K., Immunocytochemical evidence for the translocation of alpha-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIb beta 3) of human platelets to the surface membrane during the release reaction. Histochemistry, 1992. **97**: p. 381-388.
- 38. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., Bainton, D.F., *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.* J Cell Biol., 1985. **101**: p. 880-886.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., Clavien, P.A., *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration*. Science 2006. **312**: p. 104-107.
- 40. Ménard, M., Meyers, K.M., Prieur, D.J., *Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent.* Thromb Haemost., 1990. **63**: p. 127-132.
- 41. Stenberg, P.E., *Ultrastructural organization of maturing megakaryocytes*. Prog Clin Biol Res., 1986. **215**: p. 373-386.
- 42. Dangelmaier, C.A., Holmsen, H., *Determination of acid hydrolases in human platelets*. Anal Biochem, 1980. **104**: p. 182-191.
- 43. Kraemer, B.F., Campbell, R.A., Schwertz, H., Cody, M.J., Franks, Z., Tolley, N.D., Kahr, W.H., Lindemann, S., Seizer, P., Yost, C.C., Zimmerman, G.A., Weyrich, A.S., Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. PLoS Pathog., 2011. 7(11): p. 1-22.
- 44. Rao, G.H.R., *Handbook of platelet physiology and pharmacology*. Kluwer Academics Publishers, 1998.
- 45. Michelson, A.D., *Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex.* . Semin Thromb Hemost., 1992. **18**: p. 18-27.
- 46. Cutler, L., Rodan, G., Feinstein, M.B., *Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets.* Biochim Biophys Acta, 1978. **542**: p. 357-371.
- 47. White, J.G., *Interaction of membrane systems in blood platelets*. Am J Pathol., 1972. **66**: p. 295-312.
- 48. Τσελέπης, Α.Δ., Γουδέβενος, Ι.Α., Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα. προοπτικές για αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση. Ελλ Καρδιολ Επιθ., 1998. 39: p. 216-229.
- 49. Freedman, J.E., *Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis*. Circulation, 2005. **112**: p. 2725-2734.
- 50. Monroe, D.M., Hoffman, M., *What does it take to make the perfect clot?* . Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2006. **26**: p. 41-48.
- 51. Mackman, N., *The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis*. Anesth Analg., 2009. **108**: p. 1447-1452.

- 52. Heemskerk, J.W.M., Mattheij, N.J.A., Cosemans, J.M.E.M., *Platelet-based coagulation: different populations, different functions*. Thromb Haemost., 2013. **11**: p. 2-16.
- 53. Stalker, T.J., Newman, D.K., Ma, P., Wannemacher, K.M., Brass, L.F., *Platelet Signaling*. Antiplatelet agents. Handbook of Experimental Pharmacology, 2012: p. 59-85.
- 54. Barr, A.J., Brass, L.F., Manning, D.R., *Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells: a direct evaluation of selectivity in receptor-G protein coupling.* J Biol Chem., 1997. **272**: p. 2223–2229.
- 55. Coughlin, S.R., *How the protease thrombin talks to cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999. **96**: p. 11023-11027.
- 56. Ossovskaya, V.S., Bunnett, N.W., *Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease* Physiological Reviews, 2004. **84**: p. 579-621.
- 57. Keuren, J.F., Wielders, S.J., Ulrichts, H., Hackeng, T., Deckmyn, H., Heemskerk, J.W., Bevers, E., Lindhout, T., *Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005. **25**: p. 1499-1505.
- 58. Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K., Schultz, G., *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets.* Proc Natl Acad Sci USA., 1994. **91**: p. 504-508.
- 59. Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G., Offermanns S., Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. J Cell Biol., 1999. **144**: p. 745-754.
- 60. Bhatt, D.L., Topol, E.J., *Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy*. Nat Rev Drug Discov., 2003. **2**(1): p. 15-28.
- 61. Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V., Tam, C., Coughlin, S.R., *A dual thrombin receptor system for platelet activation.* Nature, 1998. **394**: p. 690-694.
- 62. Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H., Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin.* J Clin Invest., 1999. **103**: p. 879-887.
- 63. Kauskot, A., Hoylaerts, M.F., *Platelet Receptors*. Antiplatelet agents. Handbook of Experimental Pharmacology, 2012: p. 23-58.
- 64. Offermanns, S., Activation of platelet function through G protein coupled receptors. Circ Res., 2006. **99** p. 1293-1304.
- 65. Heemskerk, J.W., Feijge, M.A., Henneman, L., Rosing, J., Hemker, H.C., *The* Ca2+-mobilizing potency of a-thrombin and thrombin-receptor activating peptide on human platelets. Concentration and time effects of thrombin-induced Ca2+ signaling. Eur J Biochem., 1997. **249**: p. 547-555.

- Andersen, H., Greenberg, D.L., Fujikawa, K., Xu, W.F., Chung, D.W., Davie, E.W., Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. Proc Natl Acad Sci USA 1999. 96: p. 11189-11193.
- 67. Harrison, P., Cramer, E.M., *Platelet alpha-granules*. Blood Reviews, 1993. 7: p. 52-62.
- 68. Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J., *Platelets and the immune continuum*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(4): p. 264-274.
- 69. Xu, W.F., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W., Foster, D.C., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**: p. 6642-6646.
- De Candia, E., Hall, S.W., Rutella, S., Landolfi, R., Andrews, R.K., De Cristofaro, R., *Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets.* J Biol Chem., 2001. 276: p. 4692-4698.
- 71. López, J.A., *The platelet glycoprotein Ib-IX complex*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5**(1): p. 97-119.
- 72. Andrews, R.K., Berndt, M.C., *Platelet physiology and thrombosis*. Thromb Res., 2004. **114**: p. 447-453.
- 73. Andrews, R.K., Gardiner, E.E., Shen, Y., Berndt, M.C., *Platelet interactions in thrombosis.* IUBMB Life, 2004a. **56**: p. 13-18.
- 74. Henson, P.M., *Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence and absence of complement.* J Immunol., 1970. **104**: p. 924-934.
- 75. Siraganian, R.P., Osler, A.G., *Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate.* J Immunol., 1971. **106**: p. 1244-1251.
- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., Hanahan, D.J., , *Platelet-activating factor*. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J Biol Chem., 1979. 254 p. 9355-9358.
- 77. Imaizumi, T.A., Stafforini, D.M., Yamada, Y., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., *Platelet-activating factor: a mediator for clinicians*. J Intern Med., 1995. 238: p. 5-20.
- 78. Koltai, M., Braquet, P.G., *Involvement of PAF in atherogenesis. Brief review*. . Agents Actions Suppl., 1992. **37**: p. 333-339.
- 79. Burgers, J.A., Akkerman, J.W., *Regulation of the receptor for platelet-activating factor on human platelets.* Biochem J., 1993. **291**: p. 157-161.
- Chignard, M., Le Couedic, J.P., Tence, M., Vargaftig, B.B., Benveniste, J., *The role of platelet-activating factor in platelet aggregation*. Nature, 1979. 279: p. 799-800.

- 81. Benveniste, J., Chignard, M., Le Couedic, J.P., Vargaftig, B.B., *Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-ACETHER and lyso-PAF-ACETHER from rabbit platelets.*. Thromb Res., 1982. **25**: p. 375-385.
- Chignard, M., Le Couedic, J.P., Vargaftig, B.B., Benveniste, J., *Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents.* Br J Haematol., 1980. 46: p. 455-464.
- 83. Iwamoto, S., Kawasaki, T., Kambayashi, J., Ariyoshi, H., Monden, M., *Platelet* microparticles: A carrier of platelet-activating factor? Biochem Biophys Res Commun., 1996. **218**: p. 940-944.
- 84. Iwamoto, S., Kawasaki, T., Kambayashi, J., Ariyoshi, H., Shinoki, N., Sakon, M., Ikeda, Y., Monden, M., *The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation*. Biochem Biophys Res Commun., 1997. 239: p. 101-105.
- 85. Blank, M.L., Lee, T., Fitzgerald, V., Snyder, F., *A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid)*. J Biol Chem., 1981. **256**: p. 175-178.
- 86. Offermanns, S., Toombs, C.F., Hu, Y.H., Simon, M.I., *Defective platelet activation in Galphaq-deficient mice* Nature 1997. **389**: p. 183-186.
- Kahner, B.N., Shankar, H., Murugappan, S., Prasad, G.L., Kunapuli, S.P., Nucleotide receptor signaling in platelets. J Thromb Haemost., 2006. 4: p. 2317-2326.
- 88. Savage, B., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., *Mechanisms of platelet aggregation*. Curr Opin Hematol., 2001. **8**(5): p. 270-276.
- 89. Murugappa, S., Kunapuli, S.P., *The role of ADP receptors in platelet function*. Front Biosci., 2006. **11**: p. 1977-1986.
- 90. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol., 2006. **46**: p. 277-300.
- 91. Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., et al., *International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.* Pharmacological Reviews, 2006. **58**: p. 281-341.
- 92. Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P., *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets.* J Biol Chem., 1998. **273**: p. 2030-2034.
- Savi, P., Beauverger, P., Labouret, C., Delfaud, M., Salel, V., Kaghad, M., Herbert, J.M., *Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation*. FEBS Lett., 1998. 422: p. 291-295.
- 94. Jarvis, G.E., Humphries, R.G., Robertson, M.J., Leff, P., ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y(1) and P(2T) receptors. Br J Pharmacol., 2000. **129**: p. 275-282.

- 95. Geiger, J., Hönig-Liedl, P., Schanzenbächer, P., Walter, U., *Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors*. Eur J Pharmacol., 1998. **351**: p. 235-246.
- 96. Ohlmann, P., Castro, S., Brown, G.G., Gachet, C., Jacobson, K.A., Harden, T.K., Quantification of recombinant and platelet P2Y(1) receptors utilizing a [(125)I]labeled high-affinity antagonist 2-iodo-N(6)-methyl-(N)-methanocarba-2'deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate ([(125)I]MRS2500). Pharmacological Research, 2010. 62(4): p. 344-351.
- 97. Mangin, P., Ohlmann, P., Eckly, A., Cazenave, J.P., Lanza, F., Gachet, C., *The P2Y* receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. Thromb and Haemost., 2004. **2**(6): p. 969-977.
- Jantzen, H.-M., Milstone, D.S., Gousset, L., Conley, P.B., Mortensen, R.M., Impaired activation of murine platelets lacking Galphai2. J Clin Invest., 2001. 108: p. 477-483.
- 99. Yang, J., Wu, J., Jiang, H., et al., Signaling through Gi family members in platelets
 Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. J Biol Chem., 2002. 277: p. 46035-46042.
- 100. Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature, 2001. **409**: p. 202-207.
- 101. Hechler, B., Gachet, C., *P2 receptors and platelet function*. Purinergic Signal, 2011. **7**: p. 293-303.
- 102. Zhang, F.L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y.H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T.M., Palmer, K., Bayne, M., Monsma, F.J., ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. J Biol Chem., 2001. 276: p. 8608-8615.
- 103. Hardy, A.R., Jones, M.L., Mundell, S.J., Poole, A.W., *Reciprocal cross-talk* between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. Blood, 2004. **104**(6): p. 1745-1752.
- 104. Jin, J., Kunapuli, S.P., Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. Proceedings National Academy Science USA, 1998a. 95(14): p. 8070-8074.
- 105. Quinton, T.M., Kim, S., Dangelmaier, C., Dorsam, R.T., Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P., Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. Biochem J., 2002. 368: p. 535-543.
- 106. Dangelmaier, C., Jin J, Smith JB, Kunapuli SP., *Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway*. Thromb Haemost., 2001. **85**: p. 341-348.

- 107. Kunapuli, S.P., Dorsam, R.T., Kim, S., Quinton, T.M., *Platelet purinergic receptors*. Curr Opin Pharmacol., 2003. **3**: p. 175-180.
- 108. Gachet, C., *ADP receptors of platelets and their inhibition*. Thromb Haemost., 2001. **86**: p. 222-232.
- 109. Storey, R.F., Judge, H.M., Wilcox, R.G., Heptinstall, S., Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y12 receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. Thromb Haemost., 2002. **88**: p. 488-494.
- 110. Mahaut-Smith, M.P., Ennion, S.J., Rolf, M.G., Evans, R.J., *ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets.* Br J Pharmacol., 2000. **131**: p. 108-114.
- 111. Rolf, M.G., Mahaut-Smith, M.P., *Effects of enhanced P2X1 receptor Ca2+ influx* on functional responses in human platelets. Thromb Haemost., 2002. **88**: p. 495-502.
- 112. Rolf, M.G., Brearley, C.A., Mahaut-Smith, M.P., *Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha, beta-methylene ATP.* Thromb Haemost., 2001: p. 303-308.
- 113. Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Vermylen, J., Hoylaerts, M.F., *P2X(1)-mediated* activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. Blood, 2002. **100** p. 2499-2505.
- Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Cornelissen, H., De Vos, R., Vermylen, J., Hoylaerts, M.F., *P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation.* J Biol Chem., 2003.
 278: p. 46661-46667.
- 115. Fung, C.Y., Brearley, C.A., Farndale, R.W., Mahaut-Smith, M.P., A major role for P2X1 receptors in the early collagen-evoked intracellular Ca²⁺ responses of human platelets. Thromb Haemost., 2005. 94: p. 37-40.
- 116. Oury, C., Kuijpers, M.J., Toth-Zsamboki, E., Bonnefoy, A., Danloy, S., Vreys, I., Feijge, M.A., De Vos, R., Vermylen, J., Heemskerk, J.W., Hoylaerts, M.F., Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. Blood 2003. 101: p. 3969-3976.
- 117. Nuyttens, B.P., Thijs, T., Deckmyn, H., Broos, K. , *Platelet adhesion to collagen*. Thromb Res., 2011. **127**: p. 26-29.
- Alberio, L., Dale, G.L., Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. Eur J Clin Invest., 1999. 29: p. 1066-1076.
- 119. Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N.C., Clemetson, K.J., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors.* J Biol Chem., 1999. **274**: p. 29019-29024.

- 120. Gibbins, J.M., *Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation*. J Cell Sci., 2004. **117**: p. 3415-3425.
- 121. Watson, S.P., Auger, J.M., McCarty, O.J., Pearce, A.C., *GPVI and integrin alphallb beta3 signaling in platelets.* J Thromb Haemost., 2005. **3**: p. 1752-1762.
- 122. Watson, S., Berlanga, O., Best, D., Frampton, J., Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? Platelets, 2000. **11**: p. 252-258.
- 123. Keely, P.J., Parise, L.V., *The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets.* J Biol Chem., 1996. **271**: p. 26668-26676.
- 124. Consonni, A., Cipolla, L., Guidetti, G., et al., *Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase beta in platelet integrin alpha2beta1 signaling.* Blood, 2012. **119**: p. 847-856.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., et al., *Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen.* EMBO J., 2001. 20: p. 2120-2130.
- 126. Kuijpers, M.J., Schulte, V., Bergmeier, W., et al., *Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo.* FASEB J., 2003. **17**: p. 685-687.
- 127. Schmaier, A.A., Zou, Z., Kazlauskas, A., et al., *Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor to adopt a hemostatic role*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106: p. 21167-21172.
- Poole, A., Gibbins, J.M., Turner, M., et al., *The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen*. EMBO J., 1997. 16: p. 2333-2341.
- 129. Nesbitt, W.S., Giuliano, S., Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Harper, I.S., Jackson, S.P., *Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth.* J Cell Biol., 2003. **160**: p. 1151-1161.
- Kulkarni, S., Nesbitt, W.S., Dopheide, S.M., Hughan, S.C., Harper, I.S., Jackson, S.P., *Techniques to examine platelet adhesive interactions under flow*. Methods Mol Biol., 2004. 272: p. 165-186.
- 131. Smith, W.L., Marnett, L.J., DeWitt, D.L., *Prostaglandin and thromboxane biosynthesis*. Pharmacol Ther., 1991. **49**: p. 153-179.
- 132. Patrono, C., Rodriguez, L.A., Landolfi, R., Baigent, C., *Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis.* N Engl J Med., 2005. **353**: p. 2373-2383.
- Halushka, P.V., Allan, C.J., Davis-Bruno, K.L., *Thromboxane A2 receptors*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1995. 12: p. 361-378.
- 134. Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S., International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmacol Rev., 1994. **46**: p. 205-229.

- 135. Ushibuki, F., Hirata, M., Narumiya, S., *Platelet prostaglandin receptors in platelets and their factors*. Handbook of Experimental Pharmacology, 1997: p. 135-154.
- 136. Ushikubi, F., Hirata, M., Narumiya, S., *Molecular biology of prostanoid receptors; an overview*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1995. **12**: p. 343-359.
- 137. Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., Narumiya, S., *Two* thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. J Clin Invest., 1996. **97**: p. 949-956.
- 138. Habib, A., FitzGerald, G.A., Maclouf, J., *Phosphorylation of the thromboxane* receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. J Biol Chem., 1999. **274**: p. 2645-2651.
- 139. FitzGerald, G.A., Mechanisms of platelet activation: Thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. The American Journal of Cardiology, 1991.
 68: p. 11-15.
- Brass, L.F., Shaller, C.C., Belmonte, E.J., Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. J Clin Invest., 1987. 79: p. 1269-1275.
- Saltzman, A.G., Morse, B., Whitman, M.M., Ivanshchenko, Y., Jaye, M., Felder, S., *Cloning of the human serotonin 5-HT2 and 5-HT1C receptor subtypes*. Biochem Biophys Res Commun., 1991. 181: p. 1469-1478.
- 142. Pletscher, A., *The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology*. Int J Cardiol., 1987. **14**: p. 177-188.
- 143. Kaywin, P., McDonough, M., Insel, P.A., Shattil, S.J., Platelet function in essential thrombocythemia: decreased epinephrine responsivenesss associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors N Engl J Med., 1978. 299: p. 505-509.
- 144. Newman, K.D., Williams, L.T., Bishopric, N.H., Lefkowitz, R.J., *Identification of alpha-adrenergic receptors in human platelets by 3 H-dihydroergocryptine binding*. J Clin Invest., 1978. **61**: p. 395-402.
- 145. Motulsky, H.J., Insel, P.A., [3 H]Dihydroergocryptine binding to alpha-adrenergic receptors of human platelets. A reassessment using the selective radioligands [3 H]prazosin, [3 H]yohimbine, and [3 H]rauwolscine. Biochem Pharmacol., 1982.
 31: p. 2591-2597.
- 146. Yang, J., Wu, J., Kowalska, M.A., Dalvi, A., Prevost, N., O'Brien, P.J., Manning, D., Poncz, M., Lucki, I., Blendy, J.A., Brass, L.F., Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97: p. 9984-9989.
- 147. Pozgajová, M., Sachs, U.J., Hein, L., Nieswandt, B., *Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor*. Blood, 2006. **108**: p. 510-514.

- 148. Woulfe, D., Jiang, H., Mortensen, R., Yang, J., Brass, L.F., *Activation of Rap1B by Gi family members in platelets*. J Biol Chem., 2002. **277**: p. 23382-23390.
- 149. Paul, B.Z., Ashby, B., Sheth, S.B., *Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells.* Br J Haematol., 1998. **102**: p. 1204-1211.
- 150. Ma, H., Hara, A., Xiao, C.Y., Okada, Y., Takahata, O., Nakaya, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S., Ushikubi, F., *Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3).* Circulation, 2001. **104**: p. 1176-1180.
- 151. Gross, S., Tilly, P., Hentsch, D., Vonesch, J.L., Fabre, J.E., Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors J Exp Med., 2007. **204**: p. 311-320.
- 152. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., Neumeier, D., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. J Clin Invest., 1996. 97(7): p. 1715-1722.
- 153. Kroll, M.H., Harris, T.S., Moake, J.L., Handin, R.I., Schafer, A.I., von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. J Clin Invest., 1991. 88(5): p. 1568-1573.
- 154. Loftus, J.C., Liddington, R.C., *Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction.* J Clin Invest., 1997. **99**: p. 2302-2306.
- 155. Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., Yamada, K.M., Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. J Cell Biol., 1996. **135**: p. 1633-1642.
- 156. Juliano, R., Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. Bioessays, 1996. 18: p. 911-917.
- 157. Peerschke, E.I., Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets. Thromb Haemost., 1995. 73: p. 862-867.
- Siess, W., Molecular mechanisms of platelet activation. Physiol Rev., 1989. 69(1): p. 58-178.
- Jennings, L.K., Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. Thromb Haemost., 2009. 102(2): p. 248-257.
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., Nieswandt, B., *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2008. 28(3): p. 403-412.
- 161. Brass, L.F., Thrombin and platelet activation. Chest, 2003. 124: p. 18-25.
- 162. Brummel, K.E., Paradis, S.G., Butenas, S., Mann, K.G., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. Blood, 2002. **100**(1): p. 148-152.

- 163. Mann, K.G., *Thrombin formation*. Chest, 2003. **124**: p. 4-10.
- 164. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007.
 109(12): p. 5087-5095.
- 165. Horstman, L.L., Jy, W., Jimenez, J.J., Ahn, Y.S., *Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction*. Front Biosci., 2004. **9**(1): p. 1118-1135.
- 166. Smalley, D.M., Root, K.E., Cho, H., Ross, M.M., Ley, K., Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. Thromb Haemost., 2007. 97(1): p. 67-80.
- 167. Jy, W., Horstman L.L., Jimenez, J.J., Ahn, Y.S., Biró, E., Nieuwland, R., Sturk, A., Dignat-George, F., Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Hugel, B., Zobairi, F., Freyssinet, J.M., Nomura, S., Shet, A.S., Key, N.S., Hebbel, R.P., *Measuring circulating cell-derived microparticles*. J Thromb Haemost., 2004. 2(10): p. 1842-1851.
- 168. Lynch, S.F., Ludlam, C.A., *Plasma microparticles and vascular disorders*. Br J Haematol., 2007. **137**(1): p. 36-48.
- 169. Diamant, M., Tushuizen, M.E., Sturk, A., Nieuwland, R., Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? Eur J Clin Invest., 2004. 34(6): p. 392-401.
- George, J.N., Thoi, L.L., McManus, L.M., Reimann, T.A., Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. Blood, 1982. 60(4): p. 834-840.
- 171. Leroyer, A.S., Tedgui, A., Boulanger, C.M., *Role of microparticles in atherothrombosis.* J Intern Med., 2008. **263**(5): p. 528-537.
- 172. Morel, O., Morel, N., Freyssinet, J.M., Toti, F., *Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses.* Platelets, 2008. **19**(1): p. 9-23.
- Cauwenberghs, S., Feijge, M.A., Harper, A.G., Sage, S.O., Curvers, J., Heemskerk, J.W., Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. FEBS Lett., 2006. 580(22): p. 5313-5320.
- 174. Barry, O.P., Pratico D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., *Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles*. J Clin Invest., 1997. **99**(9): p. 2118-2127.
- 175. Schwarz, M., Katagiri, Y., Kotani, M., Bassler, N., Loeffler, C., Bode, C., Peter, K., *Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa (alphaIIbbeta3, CD41/CD61).* J Pharmacol Exp Ther., 2004. **308**(3): p. 1002-1011.
- 176. George, J.N., Pickett, E.B., Saucerman, S., McEver, R.P., Kunicki, T.J., Kieffer, N., Newman, P.J., *Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and*

observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. J Clin Invest., 1986. **78**(2): p. 340-348.

- 177. Silverstein, R.L., Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. Cleve Clin J Med., 2009. **76**: p. 27-30.
- 178. Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reca, R., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M.Z., *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells.* Exp Hematol., 2002. **30**(5): p. 450-459.
- 179. Piccin, A., Murphy, W.G., Smith, O.P., *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications.* Blood Rev., 2007. **21**(3): p. 157-171.
- Losy, J., Niezgoda, A., Wender, M., Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions. J Neuroimmunol., 1999. 99(2): p. 169-172.
- 181. Fajardo, L.F., *The complexity of endothelial cells*. American Journal of Clinical Pathology, 1989: p. 241-250.
- 182. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium I. Structure, function, and mechanisms.* Circ Res., 2007. **100**: p. 158-173.
- 183. Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L.F., Rezzani, R., Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. Biomed Res Int., 2014: p. 1-28.
- 184. Zhang, Q., Liu, L., Zheng, X.Y., *Protective roles of HDL, apoA-I and mimetic peptide on endothelial function: Through endothelial cells and endothelial progenitor cells.* Int J Cardiol., 2009. **133**: p. 286-292.
- 185. Op, D.B., M.M., Verrips, T., Post, J.A., Braam, B., Van Riel, N.H., Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2004. 287: p. 2651-2658.
- 186. Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C., Hunt, P., *Platelets* generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. Blood, 1995. **85**: p. 402-413.
- 187. Balduini, A., Malara, A., Balduini, C.L., Noris, P., *Megakaryocytes derived from* patients with the classical form of Bernard-Soulier syndrome show no ability to extend proplatelets in vitro. Platelets, 2011. **22**: p. 308-311.
- 188. Van den Oudenrijn, S., Von dem Borne, A.E., De Haas, M., Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34(+) stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. Experimental Hematology, 2000. 28: p. 1054-1061.
- Avanzi, M.P., Chen, A., He, W., Mitchell, W.B., Optimizing megakaryocyte polyploidization by targeting multiple pathways of cytokinesis. Transfusion, 2012. 52: p. 2406-2413.

- Pineault, N., Robert, A., Cortin, V., Boyer, L., *Ex vivo differentiation of cord blood stem cells into megakaryocytes and platelets*. Methods in Molecular Biology, 2013.
 946: p. 205-224.
- 191. Boisset, J.-C., Robin, C., *On the origin of hematopoietic stem cells: Progress and controversy.* Stem Cell Research, 2012. **8**: p. 1-13.
- 192. Brixius, K., F.F., Grafb, C., Blocha, W., Endothelial progenitor cells: a new target for the prevention of cardiovascular diseases. European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, 2006. 13: p. 705-710.
- 193. Korbling, M., E.Z., , *Adult stem cells for tissue repair a new therapeutic concept?* N Engl J Med., 2003. **349**: p. 570-582.
- 194. Orlic, D., Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. Ann NY Acad Sci., 2003 **996**: p. 152-157.
- 195. Hirschi, K.K., Ingram, D.A., Yoder, M.C., *Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. , 2008. **28**: p. 1584-1595.
- 196. Fadini, G.P., Baesso, I., Albiero, M., Sartore, S., Agostini, C., Avogaro, A., *Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau.* Atherosclerosis, 2008. **197**(2): p. 496-503.
- 197. Sen, S., McDonald S.P., Coates, P.T., Bonder, C.S., *Endothelial progenitor cells:* novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. Clinical Science 2011. **120**: p. 263-283.
- 198. Masuda, H., Asahara, T., *Clonogenic assay of endothelial progenitor cells*. Trends in cardiovascular medicine, 2013. **23**: p. 99-103.
- 199. Fadini, G.P., Losordo, D., Dimmeler, S., Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. Circ Res., 2012. 110: p. 624-637.
- 200. Khakoo, A.Y., Finkel, T., *Endothelial progenitor cells*. Annu Rev Med., 2005. **56**: p. 79-101.
- 201. Hagensen, M.K., Vanhoutte, P.M., Bentzon, J.F., *Arterial endothelial cells: still the craftsmen of regenerated endothelium*. Cardiovascular Res., 2012. **95**: p. 281-289.
- 202. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., et al., *Isolation of putative progenitor* endothelial cells for angiogenesis. Science, 1997. **275**: p. 964–967.
- 203. Hur, J., Yoon, C-H, Kim, H-S, et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004. **24**: p. 288–293.
- 204. Liew, A., B.F., O' Brien, T., Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. BioEssays, 2006. 28: p. 261-270.
- 205. Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A., Hebbel, R.P., Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J Clin Invest., 2000. 105: p. 71–77.

- 206. Heeschen, C., L.R., Honold, J., Assmus, B., Aicher, A., et al., *Profoundly reduced* neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. Circulation, 2004. **109**: p. 1615-1622.
- 207. Murohara, T., I.H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K., Imaizumi, T., *Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization*. J Clin Invest., 2000. **105**: p. 1527-1536.
- 208. Nagaya, N., K.K., Kanda, M., Uematsu, M., Horio, T., et al., *Hybrid cell-gene* therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. Circulation, 2003. **108**: p. 889-895.
- 209. Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X.H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., Uzan, G., *Human endothelial* cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. Blood, 2004. **103**: p. 2577-2584.
- 210. Smadja, D.M., Bieche, I., Uzan, G., Bompais, H., Muller, L., Boisson-Vidal, C., Vidaud, M., Aiach, M., Gaussem, P., PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005. 25: p. 2321-2327.
- 211. Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., Rafii, S., *Expression of VEGFR-2 and* AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood, 2000. 95: p. 952-958.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Pénicaud, L., Casteilla, L., *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives*. Circulation 2004. 109(5): p. 656-663.
- 213. Lapergue, B., M.A., Shuaib, A., *Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases*. Progress in Neurobiology, 2007. **83**: p. 349-362.
- 214. Zengin, E., C.F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N., Ergun, S., *Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis.* Development, 2006. 133: p. 1543-1551.
- Du, F., Zhou, J., Gong, R., Huang, X., Pansuria, M., Virtue, A., Li, X., Wang, H., Yang, X.-F., *Endothelial progenitor cells in atherosclerosis*. Front Biosci., 2012. 17: p. 2327-2349.
- 216. Smadja, D.M., Cornet, A., Emmerich, J., Aiach, M., Gaussem, P., *Endothelial* progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. Cell Biol Toxicol., 2007a. 23: p. 223-239.
- 217. Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., Yoder, M.C., *Identification of a novel*

hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood, 2004. **104**: p. 2752-2760.

- Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., Yoder, M.C., Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. Blood, 2005. 105: p. 2783-2786.
- 219. Skóra, J., B.J., Pupka, A., Barć, P., Sikora, J., Szyber, P., *Molecular basics of angiogenesis.* Postepy Hig Med Dosw., 2006. **60**: p. 410.
- 220. Mackie, A.R., Losordo, D.W., *CD34-positive stem cells in the treatment of heart and vascular disease in human beings.* Tex Heart Inst J., 2011. **38**(5): p. 474-485.
- 221. Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., Shaper, J.H., Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J Immunol., 1984. **133**(1): p. 157-165.
- 222. Tindle, R.W., Nichols, R.A., Chan, L., Campana, D., Catovsky, D., Birnie, G.D., A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. Leuk Res., 1985. **9**(1): p. 1-9.
- 223. Nielsen, J.S., McNagny, K.M., *Novel functions of the CD34 family*. J Cell Sci., 2008. **121**: p. 3683-3692.
- 224. Furness, S.G., McNagny, K., Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. Immunol Res., 2006. **34**(1): p. 13-32.
- 225. Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., et al., *Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34*. Blood, 1996. 87(2): p. 479-490.
- 226. Baumheter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., Lasky, L.A. , *Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34*. Science, 1993. 262(5132): p. 436-438.
- 227. Hu, M.C., Chien, S.L., *The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling.* Blood, 1998. **91**(4): p. 1152-1162.
- 228. Healy, L., May, G., Gale, K., Grosveld, F., Greaves, M., Enver, T., *The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion.* Proc Natl Acad Sci USA 1995. **92**(26): p. 12240-12244.
- 229. Majdic, O., Stockl, J., Pickl, W.F., Bohuslav, J., Strobl, H., Scheinecker, C., et al., *Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34*. Blood 1994. **83**(5): p. 1226-1234.
- 230. Doyonnas, R., Nielsen, J.S., Chelliah, S., Drew, E., Hara, T., Miyajima, A., McNagny, K.M., *Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4170-4178.

- 231. Suzuki, A., Andrew, D.P., Gonzalo, J.A., Fukumoto, M., Spellberg, J., Hashiyama, M., et al., *CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein*. Blood, 1996.
 87(9): p. 3550-3562.
- Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., Lasky, L.A., Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. Blood 1994.
 84(8): p. 2554-2565.
- 233. Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., et al., *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells* Blood, 1990. 75(12): p. 2417-2426.
- 234. Oostendorp, R.A., Harvey, K.N., Kusadasi, N., de Bruijn, M.F., Saris, C., Ploemacher, R.E., et al., *Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity*. Blood, 2002. 99(4): p. 1183-1189.
- 235. Nakayama, H., Enzan, H., Miyazaki, E., Kuroda, N., Naruse, K., Hiroi, M., Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. J Clin Pathol., 2000. **53**(8): p. 626-629.
- 236. Knapp, W., D.B., Rieder, E.P., et al., *White Cell Differentiation Antigens*. Leucocyte Typing, 1989. **IV**.
- 237. Schlossman, S., B.L., Gilks, W., et al., *White Cell Differentiation Antigens*. Leucocyte Typing, 1995. V.
- 238. Egeland, T., T.G., Steen, R., et al., *Positive selection of bone marrow-derived CD34 positive cells for possible stem cell transplantation*. Transpl. Proc., 1993. 25: p. 1261.
- Karkkainen, M.J., Petrova, T.V., Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Oncogene, 2000. 19(49): p. 5598-5605.
- 240. Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., et al., *KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells.* Science, 1999. **285**: p. 1553-1558.
- 241. Tammela, T., H.Y., Lyytikka, J., et al., *Distinct architecture of lymphatic vessels induced by chimeric vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor heparin binding domain fusion proteins.* Circ Res., 2007. **100**: p. 1468-1475.
- 242. Holmes, K., R.O., Thomas, A.M., Cross, M.J., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition.* Cell Signal, 2007. **19**: p. 2003-2012.
- 243. Stuttfeld, E., B.-H.K., *Structure and function of VEGF receptors*. IUBMB Life, 2009. **61**: p. 915-922.
- 244. Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.* Blood 1997. **90**: p. 5002-5012.

- 245. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.* Blood, 1997. 90: p. 5013-5021.
- 246. Corbeil, D., Fargeas, C.A., Huttner, W.B., *Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein.* Biochem Biophys Res Commun., 2001. **285**: p. 939-944.
- 247. Irollo, E., Pirozzi, G., *CD133: to be or not to be, is this the real question?* Am J Transl Res., 2013. **5**(6): p. 563-581.
- 248. Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., et al., *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells.* Blood, 2000. **95**: p. 3106-3112.
- 249. Mizrak, D., Brittan, M., Alison, M., *CD133: molecule of the moment.* J Pathol., 2008. **214**: p. 3-9.
- 250. Donovan, L.K., Pilkington, G.J. , *CD133: holy of grail of neuro-oncology or promiscuous red-herring?* Cell Prolif., 2012. **45**: p. 527-537.
- 251. Asahara, T., Kawamoto, A., Masuda, H., *Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine.* Stem cells, 2011. **29**: p. 1650–1655.
- 252. Bailey, A.S., Jiang, S., Afentoulis, M., et al., *Transplanted adult hematopoietic* stem cells differentiate into functional endothelial cells. Blood, 2004. **103**: p. 13-19.
- 253. Pelosi, E., Valtieri, M., Coppola, S., et al., *Identification of the hemangioblast in postnatal life*. Blood, 2002. **100**: p. 3203-3208.
- 254. Grant, M.B., May, W.S., Caballero, S., et al., *Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization*. Nat Med., 2002. **8**: p. 607-612.
- 255. Ingram, D.A., Caplice, N.M., Yoder, M.C., Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. Blood, 2005a. 106: p. 1525-1531.
- 256. Aicher, A., Rentsch, M., Sasaki, K., et al., Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. Circ Res., 2007. **100**: p. 581-589.
- 257. Timmermans, F., Van Hauwermeiren, F., De Smedt, M., et al., *Endothelial* outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2007. **27**: p. 1572-1579.
- 258. Critser, P.J., Yoder, M.C., Endothelial Colony Forming Cell role in neoangiogenesis and tissue repair. Curr Opin Organ Transplant, 2010. 15: p. 68-72.
- 259. Prater, D.N., Case, J., Ingram, D.A., Yoder, M.C., *Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells.* Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1141-1149.
- 260. Garmy-Susini, B., Varner, J.A., *Circulating endothelial progenitor cells* Br J Cancer, 2005. **93**: p. 855-858.

- 261. Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.* N Engl J Med., 2005. **353**: p. 999-1007.
- 262. Akashi, K., Weissman, I.L., *Stem cells and hematolymphoid development*. Oxford University Press: New York, 2001: p. 15-34.
- 263. Hess, D.A., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Hohm, S.A., Lahey, R., et al., Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. Blood, 2006. 107: p. 2162-2169.
- Jansen, J., Hanks, S., Thompson, J.M., Dugan, M.J., Akard, L.P., *Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood*. J Cell Mol Med., 2005. 9: p. 37-50.
- 265. Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L., *Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell.* Am J Pathol., 2006. **169**: p. 338-346.
- 266. Verfaillie, C.M., *Hematopoietic stem cells for transplantation*. Nat Immunol., 2002. **3**: p. 314-317.
- 267. Adams, G.B., Scadden, D.T., *The hematopoietic stem cell in its place*. Nat Immunol., 2006. **7**: p. 333-337.
- 268. Shizuru, J.A., Negrin, R.S., Weissman, I.L., *Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system*. Annu Rev Med., 2005. **56**: p. 509-538.
- Khan, S.S., Solomon, M.A., McCoy, J.P., Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom., 2005. 64: p. 1-8.
- 270. Seeger, F.H., Rasper, T., Koyanagi, M., Fox, H., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., CXCR4 expression determines functional activity of bone marrow-derived mononuclear cells for therapeutic neovascularization in acute ischemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2009. 29(11): p. 1802-1809.
- 271. Kim, S.W., Kim, H., Cho, H.J., Lee, J.U., Levit, R., Yoon, Y.S., Human peripheral blood-derived CD31+ cells have robust angiogenic and vasculogenic properties and are effective for treating ischemic vascular disease. J Am Coll Cardiol., 2010. 56: p. 593-607.
- 272. Kim, H., Cho, H.J., Kim, S.W., Liu, B., Choi, Y.J., Lee, J., Sohn, Y.D., Lee, M.Y., Houge, M.A., Yoon, Y.S., CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease. Circ Res., 2010. 107: p. 602-614.
- 273. Blann, A.D., Pretorius, A., Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: Two sides of the same coin, or two different coins? Atherosclerosis 2006.
 188: p. 12-18.
- 274. Elshal, M.F., Khan, S.S., Takahashi, Y., Solomon, M.A., McCoy Jr, J.P., CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of

lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. Blood, 2005. **106**: p. 2923-2924.

- 275. Friedrich, E.B., Walenta, K., Scharlau, J., Nickenig, G., Werner, N., A CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. Circ Res., 2006. **98**: p. 20–25.
- 276. Case, J., Mead, L.E., Bessler, W.K., et al. , *Human CD34(+)AC133(+)VEGFR-2(+) cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors*. Exp Hematol., 2007. 35: p. 1109-1118.
- 277. Ohtani, K., Vlachojannis, G.J., Koyanagi, M., Boeckel, J.N., Urbich, C., Farcas, R., Bonig, H., Marquez, V.E., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., *Epigenetic regulation of endothelial lineage committed genes in pro-angiogenic hematopoietic and endothelial progenitor cells.* Circ Res., 2011. **109**: p. 1219-1223.
- 278. Kawamoto, A., Iwasaki, H., Kusano, K., Murayama, T., Oyamada, A., Silver, M., Hulbert, C., Gavin, M., Hanley, A., Ma, H., Kearney, M., Zak, V., Asahara, T., Losordo, D.W., *Cd34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells.* Circulation, 2006. **114**: p. 2163-2169.
- 279. Ramos, A.L., Darabi, R., Akbarloo, N., Borges, L., Catanese, J., Dineen, S.P., Brekken, R.A., Perlingeiro, R.C., *Clonal analysis reveals a common progenitor for endothelial, myeloid, and lymphoid precursors in umbilical cord blood.* Circ Res., 2010. **107**: p. 1460-1469.
- 280. Masuda, H., Alev, C., Akimaru, H., Ito, R., Shizuno, T., Kobori, M., Horii, M., Ishihara, T., Isobe, K., Isozaki, M., Itoh, J., Itoh, Y., Okada, Y., McIntyre, B.A., Kato, S., Asahara, T., *Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential*. Circ Res., 2011. 109: p. 20-37.
- 281. Kocher, A.A., Schuster, M.D., Szabolcs, M.J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N.M., Itescu, S., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function* Nat Med., 2001. 7: p. 430-436.
- 282. Madeddu, P., Emanueli, C., Pelosi, E., et al., *Transplantation of low dose CD34+KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs.* FASEB J., 2004. **18**: p. 1737-1739.
- 283. Fadini, G.P., de Kreutzenberg, S.V., Coracina, A., et al., *Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk.* Eur Heart J., 2006. **27**: p. 2247-2255.
- 284. Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., et al., *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004. **24**: p. 1442-1447.
- 285. Schmidt-Lucke, C., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Tschope, C., Schultheiss, H.P., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., *Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ishage protocol.* PLoS One, 2010. **5**(11): p. 1-7.

- 286. Schmidt-Lucke, C., Rossig, L., Fichtlscherer, S., et al., Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. Circulation, 2005. 111: p. 2981-2987.
- 287. Case, J., Haneline, L.S., Yoder, M.C., Ingram, D.A., *Reply to Fadini et al: critical assessment of putative endothelial progenitor phenotypes*. Exp Hematol., 2007a. 35: p. 1481-1482.
- 288. Schober, A., Hristov, M., Kofler, S., Forbrig, R., Lohr, B., Heussen, N., Zhe, Z., Akhtar, S., Schumann, U., Krotz, F., Leibig, M., Konig, A., Kaczmarek, I., Reichart, B., Klauss, V., Weber, C., Sohn, H.Y., Cd34+ cd140b+ cells and circulating cxcl12 correlate with the angiographically assessed severity of cardiac allograft vasculopathy. Eur Heart J., 2011. 32: p. 476-484.
- 289. Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P.J., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.* N Engl J Med., 2003. **348**: p. 593–600.
- 290. Ito, H., Rovira, II, Bloom, ML, et al., *Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin.* Cancer Res., 1999. **59**: p. 5875–5877.
- 291. Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M., March, K.L., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.* Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-1169.
- 292. Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., et al., *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals*. Blood, 2007. 109: p. 1801-1809.
- 293. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**: p. 3422–3427.
- 294. Gunsilius, E., Duba, H-C., Petzer, A.L., et al., *Evidence from a leukaemia model* for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. The Lancet, 2000. **355**: p. 1688-1691.
- 295. Hur, J., Yang, H.M., Yoon, C.H., Lee, C.S., Park, K.W., Kim, J.H., Kim, T.Y., Kim, J.Y., Kang, H.J., Chae, I.H., Oh, B.H., Park, Y.B., Kim, H.S., *Identification of a novel role of t cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies*. Circulation, 2007. **116**: p. 1671–1682.
- 296. Rohde, E., Bartmann, C., Schallmoser, K., Reinisch, A., Lanzer, G., Linkesch, W., Guelly, C., Strunk, D. , *Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro*. Stem Cells, 2006. **24**: p. 357–367.
- 297. Prokopi, M., Pula, G., Mayr, U., et al., *Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures.* Blood, 2009. **114**: p. 723-732.
- 298. Asosingh, K., Aldred, M.A., Vasanji, A., et al., *Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Am J Pathol., 2008. **172**: p. 615-627.

- 299. Yoon, C.-H., Hur, J.H., Park, K.-W., Kim, J.-H., Lee, C.-S., Oh, I.-Y., Kim, T.-Y., Cho, H.-J., Kang, H.-J., Chae, I.-H., Yang, H.-K., Oh, B.-H., Park, Y.-B., Kim, H.-S., Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. Circulation, 2005. **112**(11): p. 1618-1627.
- 300. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., et al., Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res., 2001. **89**: p. 1-7.
- 301. Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., et al., HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway J Clin Invest., 2001. 108: p. 391-397.
- 302. Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., Ng, M.K., Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: Insights from a novel human angiogenesis assay. Journal of the American College of Cardiology, 2008. 51(6): p. 660-668.
- 303. Gulati, R., Jevremovic, D., Peterson, T.E., Chatterjee, S., Shah, V., Vile, R.J., Simari, R.D., *Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood.* Circ Res., 2003. **93**: p. 1023-1025.
- 304. Nuzzolo, E.R., Capodimonti, S., Martini, M., Iachininoto, M.G., Bianchi, M., Cocomazzi, A., Zini, G., Leone, G., Larocca, L.M., Teofili, L., *Adult and cord blood endothelial progenitor cells have different gene expression profiles and immunogenic potential.* Blood Transfus., 2014: p. 367-374.
- 305. Traish, A.M., Galoosian, A., Androgens modulate endothelial function and endothelial progenitor cells in erectile physiology. Korean J Urol., 2013. 54: p. 721-731.
- 306. Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., *Cell to cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?*. Circ Res., 2005. **96**: p. 1039-1041.
- 307. Rechavi, O., Erlich, Y., Amram, H., Flomenblit, L., Karginov, F.V., Goldstein, I., Hannon, G.J., Kloog, Y., *Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral* nonautonomously encoded small rnas. Genes Dev., 2009. 23: p. 1971-1979.
- 308. Collino, F., Deregibus, M.C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., Camussi, G., *Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs.* PLoS One, 2010. 5(7): p. 1-15.
- Prokopi, M., Mayr, M., Proteomics: A Reality-Check for putative stem cells. Circ Res., 2011. 108: p. 499-511.
- 310. Kim, S.J., Kim, J.S., Papadopoulos, J., Wook Kim, S., Maya, M., Zhang, F., He, J., Fan, D., Langley, R., Fidler, I.J. , *Circulating monocytes expressing CD31: implications for acute and chronic angiogenesis*. Am J Pathol., 2009. **174**: p. 1972-1980.

- 311. Woodfin, A., Voisin, M.B., Nourshargh, S. , PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2007. 27: p. 2514-2523.
- 312. Selheim, F., Holmsen, H., Vassbotn, F.S., *Identification of functional VEGF* receptors on human platelets FEBS Lett., 2002. **512**: p. 107-110.
- 313. Pula, G., Mayr, U., Evans, C., Prokopi, M., Vara, D.S., Yin, X., Astroulakis, Z., Xiao, Q., Hill, J., Xu, Q., Mayr, M., *Proteomics identifies thymidine phosphorylase* as a key regulator of the angiogenic potential of colony-forming units and endothelial progenitor cell cultures. Circ Res., 2009. **104**: p. 32-40.
- 314. Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Sasaki, K., Bruhl, T., Farhadi, M.R., Vajkoczy, P., Hofmann, W.K., Peters, C., Pennacchio, L.A., Abolmaali, N.D., Chavakis, E., Reinheckel, T., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., *Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization*. Nat Med., 2005a. **11**: p. 206-213.
- 315. Daub, K., Langer, H., Seizer, P., et al., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells*. FASEB J., 2006. 20: p. 2559-2561.
- 316. de Boer, H.C., Verseyden, C., Ulfman, L.H., et al., Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2006. 26: p. 1653-1659.
- 317. Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., et al., *Platelet-derived* microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. Blood, 2001. **98**: p. 3143-3149.
- 318. Dernbach, E., Randriamboavonjy, V., Fleming, I., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., Urbich, C., *Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk factors*. Basic Res Cardiol., 2008. **103**: p. 572-581.
- 319. Stellos, K., Langer, H., Daub, K., et al., *Platelet-derived stromal cell derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells.* Circulation, 2008. **117**: p. 206-215.
- 320. VanWijk, M.J., VanBavel, E., Sturk, A., Nieuwland, R., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res., 2003. **59**: p. 277-287.
- 321. Simak, J., Gelderman, M.P., *Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers.* Transfus Med Rev., 2006. **20**: p. 1-26.
- 322. Meneveau, N., Deschaseaux, F., Seronde, M.F., Chopard, R., Schiele, F., Jehl, J., Tiberghien, P., Bassand, J.P., Kantelip, J.P., Davani, S., *Presence of endothelial* colony-forming cells is associated with reduced microvascular obstruction limiting infarct size and left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. Basic Res Cardiol., 2011. **106**: p. 1397-1410.

- 323. Wang, C.H., Hsieh, I.-C., Su Pang, J.H., Cherng, W.J., Lin, S.J., Tung, T.-H., Mei, H.-F., *Factors associated with purity, biological function, and activation potential of endothelial colony-forming cells.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2011. **300**: p. 586-594.
- 324. Reinisch, A., Hofmann, N.A., Obenauf, A.C., Kashofer, K., Rohde, E., Schallmoser, K., Flicker, K., Lanzer, G., Linkesch, W., Speicher, M.R., Strunk, D., *Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo.* Blood, 2009. **113**: p. 6716-6725.
- 325. Gunetti, M., Noghero, A., Molla, F., Staszewsky, L.I., de Angelis, N., Soldo, A., Russo, I., Errichiello, E., Frasson, C., Rustichelli, D., Ferrero, I., Gualandris, A., Berger, M., Geuna, M., Scacciatella, P., Basso, G., Marra, S., Bussolino, F., Latini, R., Fagioli, F., *Ex vivo-expanded bone marrow cd34(+) for acute myocardial infarction treatment: In vitro and in vivo studies.* Cytotherapy, 2011. **13**: p. 1140-1152.
- 326. Yang, J., Ii, M., Kamei, N., Alev, C., Kwon, S.M., Kawamoto, A., Akimaru, H., Masuda, H., Sawa, Y., Asahara, T., Cd34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow. PLoS One, 2011. 6(5): p. 1-14.
- 327. Urbich, C., Dimmeler, S., *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. Circ Res., 2004. **95**: p. 343-353.
- 328. Di Santo, S., Yang, Z., Wyler von Ballmoos, M., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I., Kalka, C., *Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation.* PLoS One, 2009. **4**: p. 1-23.
- 329. Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W.K., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. J Mol Cell Cardiol., 2005. 39: p. 733-742.
- 330. Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Mees, B., Schaper, W., A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. Circ Res., 2004. **94**: p. 573-574.
- 331. Rohde, E., Malischnik, C., Thaler, D., Maierhofer, T., Linkesch, W., Lanzer, G., Guelly, C., Strunk, D., *Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells*. Stem Cells, 2006a. 24: p. 357–367.
- 332. Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminaite, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P., *Adult* bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. Blood, 2004. **104**: p. 2084-2086.
- 333. Kim, J., Jeon, Y.J., Kim, H.E., Shin, J.M., Chung, H.M., Chae, J.I., *Comparative proteomic analysis of endothelial cells progenitor cells derived from cord bloodand peripheral blood for cell therapy*. Biomaterials, 2013. **34**: p. 1669-1685.

- 334. Murohara, T., *Cord blood-derived early outgrowth endothelial progenitor cells*. Microvasc Res., 2010. **79**(3): p. 174-177.
- 335. Kogler, G., Critser, P., Trapp, T., Yoder, M., *Future of cord blood for non-oncology uses*. Bone Marrow Transplant., 2009. **44**(10): p. 683-697.
- 336. Haylock, D.N., Nilsson, S.K., *Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation*. Curr Stem Cell Res Ther., 2007. **2**(4): p. 324-335.
- 337. Melero-Martin, J.M., Khan, Z.A., Picard, A., Wu, X., Paruchuri, S., Bischoff, J., In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. Blood, 2007. 109(11): p. 4761-4768.
- 338. Koike, N., Fukumura, D., Gralla, O., Au, P., Schechner, J.S., Jain, R.K., *Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 138-139.
- 339. Au, P., Daheron, L.M., Duda, D.G., Cohen, K.S., Tyrrell, J.A., Lanning, R.M., et al., *Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1302-1305.
- 340. Falk, E., Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol., 2006. 47: p. 7-12.
- 341. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002. 420: p. 868-874.
- 342. Fadini, G.P., A.C., Sartore, S., Avogaro, A., *Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2007. **194**: p. 46-54.
- 343. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
- 344. Mestas, J., Ley, K., *Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis.* Trends Cardiovasc Med., 2008. **18**: p. 228-232.
- 345. Ross, R., Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med., 1999. **340**: p. 115-126.
- 346. Victoria, L.T., E.J., *Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system* Circ. Res., 2007. **100**: p. 1116-1127.
- 347. Libby, P., *Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art.* Am J Cardiol., 2003. **91**: p. 3-6.
- 348. Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R., Hansson, G.K., *Transfer of CD4(+) T cells* aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. Circulation, 2000. **102**: p. 2919-2922.
- 349. Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., Hansson, G.K., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.* Arteriosclerosis, 1986. **6**: p. 131-138.
- 350. Mughal, M.M., Khan, M.K., DeMarco, J.K., Majid, A., Shamoun, F., Abela, G.S., *Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque*. Expert Rev Cardiovasc Ther., 2011. **9**(10): p. 1315-1330.

- 351. Finn, A.V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F.D., Virmani, R., *Concept of vulnerable/unstable plaque*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2010. **30**(7): p. 1282-1292.
- 352. Didangelos, A., Simper, D., Monaco, C., Mayr, M., *Proteomics of acute coronary syndromes*. Current atherosclerosis reports, 2009. **11**(3): p. 188-195.
- 353. Hirsch, E.Z., C.G., White, H.M., *Reendothelialization and maintenance of endothelial integrity in longitudinal denuded tracks in the thoracic aorta of rats.* Atherosclerosis, 1983. **46**: p. 287-307.
- 354. Reidy, M.A., B.D., Distortion of endothelial repair. The effect of hypercholesterolaemia on regeneration of aortic endothelium following injury by endotoxin. A scanning electron microscope study. Atherosclerosis, 1978. **29**: p. 459-466.
- 355. Xu, Q., *The impact of progenitor cells in atherosclerosis*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med., 2006. **3**: p. 94-101.
- 356. Takahashi, T., K.C., Masuda, H., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med., 1999. **5**: p. 434-438.
- 357. Tousoulis, D., Andreou, I., Antoniades, C., Tentolouris, C., Stefanadis, C., Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. Atherosclerosis 2008. 201: p. 236-247.
- 358. Werner, N., P.J., Laufs, U., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells modulate* vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2002. **22**: p. 1567-1572.
- 359. Kong, D., M.L., Gnecchi, M., et al., *Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries*. Circulation, 2004. 110: p. 2039-2046.
- 360. Wu, Y., I.J., Huang, J., et al., *Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium.* Circ Res., 2006. **99**: p. 315-322.
- 361. Duan, H., C.L., Sun, X., et al., LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. Thromb Haemost., 2006. 96: p. 807-815.
- 362. Ceradini, D.J., K.A., Callaghan, M.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated* by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat Med., 2004. **10**: p. 858-864.
- 363. Moreno, P.R., P.K., Fuster, V., Echeverri, D., Truszczynska, H., Sharma, S.K., Badimon, J.J., O' Connor, W.N., *Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability*. Circulation, 2004. **110**: p. 2032-2038.

- 364. Fontaine, V., F.C., Werner, N., et al., *Essential role of bone marrow fibroblast* growth factor-2 in the effect of estradiol on reendothelialization and endothelial progenitor cell mobilization. Am J Pathol., 2006. **169**: p. 1855-1862.
- 365. Murayama, T., T.O., Silver, M., et al., *Determination of bone marrow-derived* endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. Exp Hematol., 2002. **30**: p. 967-972.
- 366. Iwakura, A., L.C., Shastry, S., et al., Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. Circulation, 2003. 108: p. 3115-3121.
- 367. Walter, D.H., R.K., Bahlmann, F.H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., Nishimura, H., Losordo, D.W., Asahara, T., Isner, J.M., *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* Circulation, 2002. 105: p. 3017-3024.
- Walter, D.H., S.V., Elsner, M., Mach, S., Auch-Schwelk, W., Zeiher, A.M., *Effect* of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. Am J Cardiol., 2000. 85: p. 962-968.
- Kabmeyer, S., P.J., Custodis, P., Bahramsoltani, M., New insights in vascular development: Vasculogenesis and endothelial progenitor cells. Anat. Histol. Embryol., 2009. 38: p. 1-11.
- 370. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med., 2000. 6: p. 389-395.
- 371. Patan, S., Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. J Neurooncol., 2000. **50**: p. 1-15.
- 372. Freedman, S.B., I.J., , *Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease*. Ann Intern Med., 2002. **136**: p. 54-71.
- 373. Asahara, T., M.H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., Isner, J.M., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.* Circ Res., 1999. **85**: p. 221-228.
- 374. Shi, Q., R.S., Wu, M.H., Wijelath, E.S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L.R., Moore, M.A., Storb, R.F., Hammond, W.P., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**: p. 362-367.
- 375. Taguchi, A., S.T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H., Yoshikawa, H., Tsukamoto, Y., Iso, H., Fujimori, Y., Stern, D.M., Naritomi, H., Matsuyama, T., Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. J Clin Invest., 2004. 114: p. 330-338.

- 376. Plendl, J., S.F., Auerbach, R., Gabius, H.J., *Quantitative differences in neoglycoprotein binding for vascular endothelial cells from porcine brain, ovary, and testis in vitro.* Microvasc Res., 1995. **50**: p. 199-214.
- 377. Plendl, J., Angiogenesis and vascular regression in the ovary. Anat Histol Embryol., 2000. **29**: p. 257-266.
- 378. Kaufman, D.S., L.R., Hanson, E.T., Auerbach, R., Plendl, J., Thomson, J.A., Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. Blood, 2004. 103: p. 1325-1332.
- 379. Hirschberg, R.M., P.J., *Pododermal angiogenesis and angioadaptation in the bovine claw*. Microsc Res Tech., 2005. **66**: p. 145-155.
- 380. Bartel, H., L.A., Intussusceptive microvascular growth in the lung of larval Xenopus laevis Daudin: a light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts. Anat Embryol., 2000. 202: p. 55-65.
- 381. Djonov, V.G., G.A., Burri, P.H., Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. Anat Embryol., 2000. 202: p. 347-357.
- 382. Kirton, J.P., Xu, Q., *Endothelial precursors in vascular repair*. Microvascular Research, 2010. **79**: p. 193-199.
- 383. Hristov, M., Erl, W., Linder, S., Weber, P.C., *Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2761-2766.
- Werner, N., Nickenig, G., Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells. Limitations for therapy? Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2006a.
 26: p. 257-266.
- 385. Karra, R., Vemullapalli, S., Dong, C., Herderick, E.E., Song, X., Slosek, K., Nevins, J.R., West, M., Goldschmidt-Clermont, P.J., Seo, D., *Molecular evidence* for arterial repair in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. 102(46): p. 16789-16794.
- 386. Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., Ahn, Y.S. *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis.* Thromb Res., 2003. **109**(4): p. 175-180.
- 387. Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jimenez, J.J., Pastor, J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., de Marchena, E., Ahn, Y.S., *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes*. Am Heart J., 2003. 145(6): p. 962-970.
- 388. Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes.* Circulation, 2000. **101**(8): p. 841-843.
- 389. Preston, R.A., Jy, W., Jimenez, J.J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., Valle, M., Aime, G., Ahn, Y.S., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 211-217.

- 390. Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J.G., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J.M., Oliver, C., Sampol, J., Dignat-George, F., Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. Diabetes, 2002. 51(9): p. 2840-2845.
- 391. Werner, N., Nickenig, G., *Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease*. Annals of Medicine, 2007. **39**(2): p. 82-90.
- 392. Werner, N., Nickenig, G., *Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis.* J Cell Mol Med., 2006. **10**: p. 318-332.
- 393. Stoll, B.R., Migliorini, C., Kadambi, A., Munn, L.L., Jain, R.K., *A mathematical model of the contribution of endothelial progenitor cells to angiogenesis in tumors: implications for antiangiogenic therapy.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2555-2561.
- 394. Yamaguchi, J., Kusano, K.F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D.W., Isner, J.M., Asahara, T., Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. Circulation, 2003. 107(9): p. 1322-1328.
- 395. Jin, H., Aiyer, A., Su, J., Borgstrom, P., Stupack, D., Friedlander, M., Varner, J., *A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature*. J Clin Invest., 2006. **116**(3): p. 652-662.
- 396. Kocher, A.A., Schuster, M.D., Bonaros, N., Lietz, K., Xiang, G., Martens, T.P., Kurlanski, P., Sondermeijer, H., Witkowski, P., Boyle, A., Homma, S., Wang, S.F., Itescu, S., *Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines*. J Mol Cell Cardiol., 2006. 40(4): p. 455-464.
- 397. Klinger, M.F., *Platelets and inflammation*. Anat. Embryol., 1997. 196: p. 1-11.
- 398. Weber, C., *Platelets and chemochines in atherosclerosis: partners in crime*. Circ Res., 2005. **96**(6): p. 612-616.
- 399. Weyrich, A.S., Lindemann, S., Zimmerman, G.A., *The evolving role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost., 2003. **1**(9): p. 1897-1905.
- 400. Davis, C., Fischer, J., Ley, K., Sarembock, I.J., *The role of inflammation in vascular injury and repair*. Thromb Haemost., 2003. **1**(8): p. 1699-1709.
- 401. Coomber, B.L., Nyarko, K.A., Noyes, T.M., Gentry, P.A., *Neutrophil-platelet interactions and their relevance to bovine respiratory disease*. The Veterinary Journal, 2001. **161**(1): p. 41-62.
- 402. Kawakami, A., Osaka, M., Aikawa, M., Uematsu, S., Akira, S., Libby, P., Shimokado, K., Sacks, F.M., Yoshida, M., *Toll-like receptor 2 mediates apolipoprotein CIII-induced monocyte activation*. Circ Res., 2008. **103**(12): p. 1402-1409.
- 403. Choi, S.H., Harkewicz, R., Lee, J.H., Boullier, A., Almazan, F., Li, A.C., Witztum, J.L., Bae, Y.S., Miller, Y.I., *Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake*. Circ Res., 2009. **104**(12): p. 1355-1363.

- 404. Beaulieu, L.M., Freedman, J.E., *The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes.* Thromb Res., 2010. **125**(3): p. 205-209.
- 405. Polgar, J., Matuscova, J., Wagner, D.D., *The P-selectin, tissue factor, coagulation triad.* Thromb Haemost., 2005. **3**(8): p. 1590-1596.
- 406. Wagner, D.D., Burger, P.C., *Platelets in inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2003. **23**(12): p. 2131-2137.
- 407. Tsoumani, M.E., Kalantzi, K.I., Goudevenos, I.A., Tselepis, A.D., *Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions* Curr Vasc Pharmacol., 2012. **10**: p. 539-549.
- 408. Gawaz, M., Langer, H., May, A.E., *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest., 2005. **115**(12): p. 3378-3384.
- 409. Gawaz, M., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A., Brand, K., Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. Circulation, 1998. **98**(12): p. 1164-1171.
- 410. Dickfeld, T., Lengyel, E., May, A.E., Massberg, S., Brand, K., Page, S., Thielen, C., Langenbrink, K., Gawaz, M., *Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis.* . Cardiovasc. Res., 2001. **49**: p. 189-199.
- 411. Langer, H.F., Gawaz, M., *Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease*. Thromb Haemost., 2008. **99**: p. 480-486.
- 412. Huo, Y., Ley, K.F., *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med., 2004. **14**: p. 18-22.
- 413. Zimmermann, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., *Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions*. J Clin Invest., 1996. **98**: p. 1699-1702.
- 414. Entman, M.L., Ballantyne, C.M., Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy? Circulation, 1996. **94**: p. 1206-1208.
- 415. Massberg, S., Schulz, C., Gawaz, M., *Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome*. Semin Vasc Med., 2003. **3**: p. 147-162.
- 416. Evangelista, V., Manarini, S., Dell'Elba, G., Martelli, N., Napoleone, E., Di Santo, A., Lorenzet, P.S., *Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation*. Thromb Haemost., 2005. 94: p. 568-577.
- 417. Yang, J., Furie, B.C., Furie, B., *The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1:its role as a selectin counterreceptor in leucocyte-endothelial and leucocyte-platelet interaction* Thromb Haemost., 1999. **81**: p. 1-7.
- 418. Santoso, S., Sachs, U.J., Kroll, H., Linder, M., Ruf, A., Preissner, K.T., Chavakis, T. , *The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a*

counterreceptor for the leucocyte integrin Mac-1. J Exp Med., 2002. **196**: p. 679-691.

- 419. Stellos, K., Gawaz, M., *Platelet interaction with progenitor cells: Potential implications for regenerative medicine*. Thromb Haemost., 2007. **98**: p. 922-929.
- 420. Siegel-Axel, D., Daub, K., Seizer, P., Lindemann, S., Gawaz, M., *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis.* Cardiovasc Res., 2008. **78**: p. 8-17.
- 421. Sopova, K., Tatsidou, P., Stellos, K., *Platelets and platelet interaction with progenitor cells in vascular homeostasis and inflammation*. Curr Vasc Pharmacol., 2012. **10**(5): p. 555-562.
- 422. Daub, K., Langer, H., Seizer, P., Stellos, K., May, A., Goyal, P., Bigalke, B., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells.* FASEB J., 2006. 20: p. 2559-2561.
- 423. Massberg, S., Konrad, I., Schurzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlnhoefer, D., Hoppe, K. et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor lalpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.* J Exp Med., 2006. 203: p. 1221-1233.
- 424. Marti, G.E., Seminars in hematology: Introduction to flow cytometry. 2001. 38.
- 425. Herzenberg, L.A., *Immumology today: Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine.* 2000. **21**.
- 426. Mickelson, A.D., *Methods for the measurement of platelet function*. The American Journal of Cardiology, 2009. **103**: p. 20-26.
- 427. Lakowicz, J.R., ed. *Principles of flourescence spectroscopy*. Third edition. 2006, Plenum Press: New York.
- 428. Pawley, J.B., ed. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2006, Springer: Berlin.
- 429. Mustard, J.F., Perry DW, Ardlie NG, Packham MA., *Preparation of suspensions of washed platelets from humans*. Br J Haematol., 1972. **22**: p. 193-204.
- 430. Holme, S., Sixma JJ, Wester J, Holmsen H., *ADP-induced refractory state of platelets in vitro. Functional and ultra studies on gel filtered platelets.* Scand J Haematol., 1977. **18**: p. 267-278.
- 431. Dimitriou, A.A., Stathopoulos P, Mitsios JV, Sakarellos-Daitsiotis M, Goudevenos J, Tsikaris V, Tselepis AD., *Inhibition of platelet activation by peptide analogs of the beta(3)-intracellular domain of platelet integrin alpha(IIb)beta(3) conjugated to the cell-penetrating peptide Tat(48-60).* Platelets., 2009. **20**: p. 539-547.
- 432. Born, G.V., Dearnley, R., Foulks, J.G., Sharp, D.E., *Quantification of the* morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors. J. Physiol., 1978. **280**: p. 193-212.
- 433. Pirro, M., Schillaci, G., Romagno, P.F., Mannarino, M.R., Bagaglia, F., Razzi, R., Pasqualini, L., Vaudo, G., Mannarino, E., *Influence of short-term rosuvastatin*

therapy on endothelial progenitor cells and endothelial function. J Cardiovasc Pharmacol Ther., 2009. **14**: p. 14-21.

- 434. Kimura, T., Kohno, H., Matsuoka, Y., Murakami, M., Nakatsuka, R., Hase, M., Yasuda, K., Uemura, Y., Sasaki, Y., Fukuhara, S., Sonoda, Y., *CXCL8 enhances the angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial cells in vitro*. Cell Biol Int., 2011. **35**: p. 201-208.
- 435. Medina, R.J., O'Neill, C.L., Humphreys, M.W., Gardiner, T.A., Stitt, A.W., *Outgrowth endothelial cells: Characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010. **51**: p. 5906–5913.
- 436. Van Craenenbroeck, E.M., Vrints, C.J., Haine, S.E., Vermeulen, K., Goovaerts, I., Van Tendeloo, V.F., Hoymans, V.Y., Conraads, V.M., *A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile.* J Appl Physiol., 2008. **104**(4): p. 1006-1013.
- 437. Jie, K.E., Zaikova, M.A., Bergevoet, M.W., Westerweel, P.E., Rastmanesh, M., Blankestijn, P.J., Boer, W.H., Braam, B., Verhaar, M.C., *Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(6): p. 1875-1882.
- 438. Reece, A.S., Davidson, P., *Deficit of circulating stem progenitor cells in opiate addiction: a pilot study.* Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy, 2007.
 2: p. 1-9.
- 439. Urbich, C., Dimmeler, S., *Endothelial progenitor cells functional characterization* Trends Cardiovasc Med., 2004. **14**: p. 318-322.
- 440. Fischer, P., Rümmler, M., Schulz, C., Peschel, C., Ott, I., Oostendorp, R.A., *Altered adhesive properties of cord blood endothelial outgrowth cells expressing IL-1ra.* Immunol Cell Biol., 2010. **88**(3): p. 313-320.
- 441. Indumathi, S., Harikrishnan, R., Rajkumar, J.S., Dhanasekaran, M., Immunophenotypic comparison of heterogenous non-sorted versus sorted mononuclear cells from human umbilical cord blood: a novel cell enrichment approach. Cytotechnology, 2013.
- 442. Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S.K., *Isolation and characterization of umbilical cord blood hematopoietic stem cells.* J Med Assoc Thai., 2009. **92**(3): p. 88-94.
- 443. Williamson, K., Stringer, S.E., Alexander, M.Y., *Endothelial progenitor cells enter the aging arena*. Frontiers in Physiology, 2012. **3**: p. 1-7.
- 444. Bhatwadekar, A.D., Glenn, J.V., Gang, L., Curtis, T.M., Gardiner, T.A., Stitt, A.W., Advanced glycation of fibronectin impairs vascular repair by endothelial progenitor cells: Implications for vasodegeneration in diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2008. **49**: p. 1232-1241.

- 445. Mavromatis, K., Sutcliffe, D.J., Joseph, G., Alexander, R.W., Waller, E.K., Quyyumi, A.A., Taylor, W.R., *Proangiogenic cell colonies grown in vitro from human peripheral blood mononuclear cells*. J Biomol Screen., 2012. **17**(9): p. 1128-1135.
- 446. Voyta, J.C., V.D., Butterfield, C.E., Zetter, B.R., *Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein.* J Cell Biol., 1984. **99**: p. 2034-2040.
- 447. Holthofer, H., V.I., Kariniemi, A.L., Horima, M., Linder, E., Miettinen, A., *Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues.* Lab Investigation, 1982. **47**: p. 60-66.
- 448. Schwechheimer, K., W.G., Schnabel, P., Moller, P., *Lectin target cells in human central nervous system and the pituitary gland*. Histochemistry, 1984. **80**: p. 165-169.
- 449. Graziano, M., Potworowski, E.F., UEA-1-binding to thymic medullary epithelial cells selectively reduces numbers of cortical TCR alphabeta thymocytes in FTOCs. Immunol Lett., 2001. 77: p. 143-150.
- 450. Min, T.Q., Z.C., Xiang, W.X., Hui, Z.J., Peng, S.Y., *Improvement in endothelial* progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. Cardiovasc Drugs Ther., 2004. **18**: p. 203-209.
- 451. Shaffer, R.G., G.S., Arshi, A., Supple, G., Bantly, A., Moore, J.S., Mohler, E.R., *Flow Cytometric Measurement of Circulating Endothelial Cells: The Effect of Age and Peripheral Arterial Disease on Baseline Levels of Mature and Progenitor Populations.* Cytometry, 2006. **70**: p. 56-62.
- 452. Spigoni, V., Picconi, A., Cito, M., Ridolfi, V., Bonomini, S., Casali, C., Zavaroni, I., Gnudi, L., Metra, M., Cas, A.D., *Pioglitazone improves in vitro viability and function of endothelial progenitor cells from individuals with impaired glucose tolerance.* PLoS ONE, 2012. **7**(11): p. 1-10.
- 453. Van Craenenbroeck, E.M., Beckers, P.J., Possemiers, N.M., Wuyts, K., Frederix, G., Hoymans, V.Y., Wuyts, F., Paelinck, B.P., Vrints, C.J., Conraads, V.M., *Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure*. Eur Heart J., 2010. **31**: p. 1924-1934.
- 454. Cheng, C.-C., Chang, S.-J., Chueh, Y.-N., Huang, T.-S., Huang, P.-H., Cheng, S.-M., Tsai, T.-N., Chen, J.-W., Wang, H.-W., *Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses.* BMC Genomics, 2013. 14(182): p. 1-10.
- 455. Duan, H.-X., Cheng, L.-M., Wang, J., Hu, L.-S., Lu, G.-X., *Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood.* Cell Biology International, 2006. **30**: p. 1018-1027.
- 456. Ahrens, I., Domeij, H., Topcic, D., Haviv, I., Merivirta, R.-M., Agrotis, A., Leitner, E., Jowett, J.B., Bode, C., Lappas, M., Karlheinz, P., *Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial*

progenitor cells reveals highly differential gene expression. PLoS ONE, 2011. **6**(8): p. 1-12.

- 457. Sofrenovic, T., McEwan, K., Crowe, S., Marier, J., Davies, R., Suuronen, E.J., Kuraitis, D., *Circulating angiogenic cells can be derived from cryopreserved peripheral blood mononuclear cells.* PLoS ONE, 2012. **7**(10): p. 1-13.
- 458. Bieback, K., Vinci, M., Elvers-Hornung, S., Bartol, A., Gloe, T., Czabanka, M., Kluter, H., Augustin, H., Vajkoczy, P., *Recruitment of human cord blood-derived endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis.* Cytotherapy, 2013.
 0: p. 1-14.
- 459. Zhao, J., Bolton, E.M., Ormiston, M.L., Bradley, J.A., Morrell, N.W., Lever, A.M., Late outgrowth endothelial progenitor cells engineered for improved survival and maintenance of function in transplant-related injury. Transpl Int., 2012. **25**(2): p. 229-41.
- 460. Smadja, D.M., Laurendeau, I., Avignon, C., Vidaud, M., Aiach, M., Gaussem, P., *The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells.* J Thromb Haemost., 2006. **4**: p. 2051-2058.
- 461. Ho, J.C.Y., Wing-Hon Lai, W.-H., Ming-Fang Li, M.-F., Au, K.-W., Yip, M.-C., Wong, N.L.Y., Ng, E.S.K., Lam, F.F.Y., Siu, C.-W., Tse, H.-F., *Reversal of* endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. Diabetes Metab Res Rev., 2012. 28: p. 462-473.
- 462. Smadja, D.M., Bièche, I., Helley, D., Laurendeau, I., Simonin, G., Muller, L., Aiach, M., Gaussem, P., *Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with upregulation of integrin a*₆. J Cell Mol Med., 2007. **11**(5): p. 1149-1161.
- 463. Avouac, J., Wipff, J., Goldman, O., Ruiz, B., Couraud, P.O., Chiocchia, G., Kahan A., Boileau, C., Uzan, G., Allanore, Y., Angiogenesis in systemic sclerosis: Impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. Arthritis Rheum., 2008. 58(11): p. 3550-3561.
- 464. Mukaia, N., Akahoria, T., Komakid, M., Lia, Q., Kanayasu-Toyodae, T., Ishii-Watabee, A., Kobayashia, A., Yamaguchie, T., Abed, M., Amagasab, T., Moritaa I., A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. Experimental cell research 2008. 314: p. 430-440.
- Fleissner, F., Thum, T., Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. Antioxidants & Redox Signaling, 2011. 15: p. 933-948.
- Liu, Q., Xi, Y., Terry, T., So, S.P., Mohite, A., Zhang, J., Wu, G., Liu, X., Cheng, J., Ruan, K.H., Willerson, J.T., Dixon, R.A., *Engineered Endothelial Progenitor Cells That Overexpress Prostacyclin Protect Vascular Cells*. J Cell Physiol., 2012. 227: p. 2907-2916.

- 467. Caccia, S., Castellia, R., Maiocchia, D., Bergamaschinia L., Cugnoa, M., Interaction of C1 inhibitor with thrombin on the endothelial surface. Fibrinolysis, 2011. 22: p. 571-575.
- 468. Gödecke, S., Roderigo, C., Rose, C.R., Rauch, B.H., Gödecke, A., Schrader, J., *Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol., 2012. **302**: p. 915-923.
- 469. Ngaiza, J.R., Jaffe, E.A., *A 14 amino acid peptide derived from the amino terminus of the cleaved thrombin receptor elevates intracellular calcium and stimulates prostacyclin production in human endothelial cells.* Biochemical and biophysical research communications, 1991. **179** p. 1656-1661.
- 470. Prescott, S.M., Seeger, A.R., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Maraganore, J.M., *Hirudin-based peptides block the inflammatory effects of thrombin on endothelial cells*. The Journal of Biological Chemistry, 1990. 265: p. 9614-9616.
- 471. Kukulski, F., Ben Yebdri, F., Bahrami, F., Fausther, M., Tremblay, A., Sévigny, J., Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. Molecular Immunology, 2010. **47**: p. 991-999.
- 472. Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation.* Pharmacol Ther., 2006. **112**: p. 358-404.
- 473. Xiao, Z., Yang, M., Lv, Q., Wang, W., Deng, M., Liu, X., He, Q., Chen, X., Chen, M., Fang, L., Xie, X., Hu, J., *P2Y11 Impairs Cell Proliferation by Induction of Cell Cycle Arrest and Sensitizes Endothelial Cells to Cisplatin-Induced Cell Death.* Journal of Cellular Biochemistry 2011. **112**: p. 2257-2265.
- Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgardh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., Gudbjartsson, T., Jern, S., Erlinge, D., *P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol., 2002. 40: p. 841-853.

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης και τις μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω βραβεύσεις και δημοσιεύσεις.

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

1. Χορήγηση υποτροφίας από την Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής με τίτλο "Μελέτη του ρόλου των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) στην αθηρωματική νόσο". Διάρκεια 3 χρόνια.

2. Βράβευση του ερευνητικού πρωτοκόλλου με τίτλο: "Μελέτη της αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίων και πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs). Ρόλος στην αθηρογένεση» από το 14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λιπιδιολογίας, Αθηροσκλήρωσης και Αγγειακής Νόσου που διεξήχθη στην Αθήνα στις 13-15 Οκτωβρίου 2011.

3. Βράβευση της προφορικής ανακοίνωσης με τίτλο: "Επίδραση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro» από το 50 Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης που διεξήχθη στην Αθήνα στις 29-30 Νοεμβρίου το 2013.

4. Βράβευση της προφορικής ανακοίνωσης με τίτλο: "Επίδραση των late-outgrowth πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro" από το 2° Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης και Αντιθρομβωτικής Αγωγής (Ι.Μ.Ε.Θ.Α.) που διεξήχθη στην Αθήνα στις 11-12 Απριλίου 2014.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. ALPIC: Advanced Learning on Platelets and Thrombosis International Course. Metsovo (Greece), January 27-29, 2012. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Effect of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) on platelet activation in vitro", <u>V.G.</u> <u>Chantzichristos</u>, A.D. Tselepis.

2. 5° Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2012. Συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση με τίτλο: "Επίδραση των κυκλοφορούντων πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων και των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων", <u>Β.Γ. Χαντζηχρήστος</u>, Α.Δ. Τσελέπης.

3. ALPIC: Advanced Learning on Platelets and Thrombosis International Course. Metsovo (Greece), January 18-20, 2013. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Effect of circulating endothelial progenitor cells and mature endothelial cells on platelet activation
in vitro'', <u>V.G. Chantzichristos</u>, P. Tatsidou, F. Gkrozou, K. Kalantzi, M. Paschopoulos, A.D. Tselepis.

4. Συνέδριο Μεταπτυχιακών Σπουδών Τμήματος Χημείας, Ιωάννινα, 28-30 Μαρτίου 2013. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Επίδραση των κυκλοφορούντων πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro", <u>Β.Γ.</u> <u>Χαντζηχρήστος</u>, Φ. Γκρόζου, Κ. Καλαντζή, Μ. Πασχόπουλος, Ι. Γουδέβενος, Α.Δ. Τσελέπης.

5. 1° Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης και Αντιθρομβωτικής Αγωγής (Ι.Μ.Ε.Θ.Α.), Αθήνα, 12-13 Απριλίου 2013. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Επίδραση των κυκλοφορούντων πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro", <u>Β.Γ. Χαντζηχρήστος</u>, Φ. Γκρόζου, Κ. Καλαντζή, Μ. Πασχόπουλος, Α.Δ. Τσελέπης.

6. 81st Congress of the European Atherosclerosis Society, Lyon (France), June 2-5, 2013. Συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση με τίτλο: "Effect of endothelial progenitor cells on platelet activation in vitro", <u>V.G. Chantzichristos</u>, F. Gkrozou, M. Paschopoulos, A.D. Tselepis.

7. 5ο Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 29-30 Νοεμβρίου 2013. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Επίδραση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro", <u>Β.Γ. Χαντζηχρήστος</u>, Φ. Γκρόζου, Μ. Πασχόπουλος, Α.Δ. Τσελέπης.

8. ALPIC: Advanced Learning on Platelets and Thrombosis International Course. Metsovo (Greece), March 7-9, 2014. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Effect of late-outgrowth endothelial progenitor cells on platelet activation in vitro", <u>V.G.</u> <u>Chantzichristos</u>, F.G. Gkrozou, M.E. Paschopoulos, A.D. Tselepis.

9. 2° Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης και Αντιθρομβωτικής Αγωγής (Ι.Μ.Ε.Θ.Α.), Αθήνα, 11-12 Απριλίου 2014. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση με τίτλο: "Επίδραση των late-outgrowth πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων in vitro", <u>Β.Γ. Χαντζηχρήστος</u>, Φ. Γκρόζου, Μ. Πασχόπουλος, Α.Δ. Τσελέπης.

10. 82nd Congress of the European Atherosclerosis Society, Madrid (Spain), May 31-June 3, 2014. Συμμετοχή με moderated αναρτημένη ανακοίνωση με τίτλο: "Effect of late-outgrowth endothelial progenitor cells on platelet activation in vitro", <u>V. Chantzichristos</u>, A. Tselepis.

Μέρος της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος, το οποίο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Ανάπτυξης) και το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΣΠΑ 2007-2013). Υποέργο-Συνεργασία 2009. Πράξη Ι. «Συνεργατικά έργα μικρής και μεσαίας κλίμακας» (κωδικός έργου:09ΣΥΝ-12-827).