



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μοριακοί μηχανισμοί του VEGF στην αγγειοποίηση και εφαρμογές
στην αναγεννητική ιατρική**

ΜΑΡΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μοριακοί μηχανισμοί του VEGF στην αγγειοποίηση και εφαρμογές
στην αναγεννητική ιατρική**

ΜΑΡΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μάρκου Μαρίας: 26-11-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 785^ο/9-2-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-2-2016

«Μοριακοί μηχανισμοί του VEGF στην αγγειοποίηση και εφαρμογές στην Αναγεννητική Ιατρική»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 914^ο/3-3-2020

Παπαμαρκάκη Θωμαή	Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκόγκας Χρήστος	Ερευνητής Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)
Murphy Carol	Ερευνητρια Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-7-2020

Ιωάννινα 6-10-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η (σφραγισμένη) του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

*Στους γονείς μου,
Κατερίνα και Αηδώνη*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IBEEA-BR) στα Ιωάννινα, κατά τη χρονική περίοδο 2016-2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία από το ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση του Ανθρώπινου Ερευνητικού Δυναμικού μέσω της υλοποίησης Διδακτορικής Έρευνας, Κύκλος 1» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του Ελληνικού Δημοσίου και το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς αυτής έχει δημοσιευθεί¹.

Κατά τη διάρκεια αυτών των χρόνων απέκτησα πολύτιμες γνώσεις και εμπειρία στον εργαστηριακό χώρο. Παράλληλα όμως είχα την ευκαιρία να γνωρίσω αρκετούς ανθρώπους. Μερικοί από τους οποίους έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της “επιστημονικής μου ταυτότητας”, αλλά και με βοήθησαν να τα καταφέρω, φτάνοντας τελικά στο στόχο μου. Μερικούς από τους ανθρώπους αυτούς αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω σε αυτές τις σελίδες. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου κ. Θεόδωρο Φώτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριό του, για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγησή του όλα αυτά τα χρόνια και γενικότερα για όσα μου δίδαξε, για τον τρόπο σκέψης που μου μετέδωσε, αποτελώντας πάντα πρότυπο για τις ατέλειωτες γνώσεις του. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ερευνήτρια Β’ Carol Murphy για τις πολύτιμες συμβουλές της και για την βοήθειά της σε πολλά ζητήματα που με την αμεσότητα και τη διεκπεραιωτικότητα της με βοηθούσε να επιλύσω. Τον καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, που μας έκανε όλα τα μέλη του Ινστιτούτου να αισθανόμαστε ότι μπορούμε να απευθυνθούμε σε εκείνον οποιαδήποτε στιγμή και τον τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κούκλη, που δέχθηκαν από την αρχή αυτής της διατριβής να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή. Επίσης, όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής την Καθηγήτρια κ. Θωμαή Παπαμαρκάκη, τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο και τον Ερευνητή Β’ κ. Χρήστο Γκόγκα, που δέχτηκαν να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα της δουλειάς μου όλων αυτών των χρόνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Σοφία Μπέλλου και τη Δρ. Νικολέτα Κωστοπούλου για τη στήριξη και τις συμβουλές τους, τον Δρ. Δημήτριο Κουρούπη για την βοήθειά του στην εκτέλεση αρχικών πειραμάτων και την αισιοδοξία που πάντα μου μετέδιδε καθώς και όλα τα άτομα με τα οποία είχαμε μία εξαιρετική συνεργασία^{2,3}.

¹Markou M, Kouroupis D, Badounas F, Katsouras A, Kyrkou A, Fotsis T, Murphy C, Bagli E. Tissue Engineering Using Vascular Organoids From Human Pluripotent Stem Cell Derived Mural Cell Phenotypes. Front Bioeng Biotechnol. 2020 ; 8 :278.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Αναστασία, Ευάγγελο, Μαρία, Μιχάλη και Οδυσσέα για την κατανόηση, τη βοήθεια, τη στήριξη που μου έδειξαν ο καθένας ξεχωριστά, για όλες εκείνες τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο βιώνοντας τόσο τις χαρούμενες όσο και τις δύσκολες στιγμές. Ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ελένη Μπαγκλή -την Ελένη!-, που πέρα από την πολύτιμη, αδιάλειπτη καθοδήγησή της, που ήταν καθοριστική για την εξέλιξη αυτής της δουλειάς, ήταν πάρα πολλές οι στιγμές που κατέφευγα σε εκείνη. Στιγμές θετικές, έντονων προβληματισμών και αμφισβήτησης και που σε όλες είχε την ικανότητα να με κάνει να βλέπω με μία νέα ματιά τα πράγματα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για όλη τη στήριξη που μου προσέφεραν. Τα αδέρφια μου, Γιώργο και Παναγιώτη, τη μικρή μου Κατερίνα, τους υπέροχους γονείς μου Κατερίνα και Αηδώνη για την ελευθερία που μου έδιναν πάντα και το γεγονός ότι στήριζαν τις επιλογές μου, διδάσκοντάς μου να παίρνω μόνη μου τις αποφάσεις για τη ζωή μου να είμαι υπεύθυνη γι' αυτές, έτοιμη για τις όποιες περισσότερο ή λιγότερο θετικές συνέπειες.

²Mechanical stress affects methylation pattern of GNAS isoforms and osteogenic differentiation of hAT-MSCs. Vlaiou AM, Kouroupis D, Sgourou A, Markopoulos GS, Bagli E, **Markou M**, Papadopoulou Z, Fotsis T, Nakos G, Lekka ME, Syrrou M. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017 Aug;1864(8):1371-1381. 14

³Medium-term Electrophysiologic Effects of a Cellularized Scaffold Implanted in Rats After Myocardial Infarction. Kolettis TM, Bagli E, Barka E, Kouroupis D, Kontonika M, Vilaeti AD, **Markou M**, Roumpi M, Maltaba V, La Rocca V, Agathopoulos S, Fotsis T. Cureus. 2018 Jul 10;10(7): e2959.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Τα αιμοφόρα αγγεία και τα κύτταρα που τα απαρτίζουν	2
1.1.1 Τα ενδοθηλιακά κύτταρα	5
1.1.2 Τα τοιχωματικά κύτταρα	7
1.1.2.I Τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMC)	9
1.1.2.II Τα περικύτταρα (PC).....	11
1.1.2.III Προέλευση των MC	12
1.2 Η δημιουργία νέων αγγείων	13
1.2.1 Η αγγειοποίηση (vasculogenesis).....	15
1.2.2 Η αγγειογένεση (angiogenesis)	17
1.2.3 Η αγγειακή μυογένεση	20
1.2.4 Ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	22
1.2.4.I Οι υποδοχείς του VEGF	23
1.2.4.II Ο ρόλος των συν-υποδοχέων στη σηματοδότηση του VEGF.....	24
1.2.4.III Η ενεργοποίηση και σηματοδότηση από τον VEGFR2.....	25
1.3 Δημιουργία αγγειωμένων ιστικών κατασκευών <i>in vitro</i>	28
1.3.1 Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα ως πηγή αγγειακών κυττάρων	30
1.3.1.I Τα βλαστικά κύτταρα (Stem Cells)	30
1.3.1.II Στρατηγικές διαφοροποίησης ανθρώπινων PSC προς αγγειακά κύτταρα	33
1.3.2 Δημιουργία 3D ιστικών κατασκευών με τη χρήση ικριωμάτων	36
1.3.3 Αυτοοργάνωση των κυττάρων σε 3D δομές	37
1.4 ΣΚΟΠΟΣ	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Καλλιέργεια των hPSC (hESC, hiPSC).....	41
2.2 Διαφοροποίηση των hESC σε EC.....	42
2.2.1 Απομόνωση CD34+ κυττάρων με τη χρήση αντι-CD34 ανοσομαγνητικών σφαιριδίων	43
2.2.2 In vivo σήμανση των κυττάρων με μη λειτουργικό αντίσωμα έναντι του VEGFR2.....	44
2.3 Απομόνωση και καλλιέργεια EC από φλέβα ομφάλιου λώρου (HUVEC).....	45
2.4 Διαφοροποίηση των hPSC προς cSMC και sSMC	46
2.5 Λειτουργικές δοκιμασίες των hPSC-cSMC/sSMC.....	47
2.5.1 Συσταλτότητα των hPSC-cSMC.....	47

2.5.2 Πολλαπλασιαστικό δυναμικό των hPSC-SMC.....	47
2.5.3 Μεταναστευτική ικανότητα των hPSC-SMC.....	48
2.5.4 Ενεργότητα μεταλλοπρωτεϊνών των hPSC-SMC.....	48
2.5.5 Ολιγοδυναμία των hPSC-SMC.....	49
2.5.6 Δοκιμασία <i>in vitro</i> αγγειογένεσης.....	50
2.5.7 Επαγωγή της οργάνωσης των EC σε δίκτυο κατά τη συγκαλλιέργειά τους με τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC σε 2D	51
2.6 Δημιουργία αγγειακών οργανοειδών	51
2.6.1 Παρασκευή μεθυλοκυτταρίνης.....	51
2.6.2 Δημιουργία αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών.....	52
2.7 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή <i>in vitro</i>	53
2.7.1 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε matrigel	53
2.7.2 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης.....	53
2.7.3 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε υδρογέλη ινωδογόνου	54
2.8. Δοκιμασία <i>in vivo</i> αγγειογένεσης.....	54
2.9 Μεμβρανική χρώση κυττάρων.....	55
2.10 Ανοσοφθορισμός.....	56
2.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western	57
2.12 Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence-activated cell sorting, FACS).....	58
2.13 Απομόνωση και έλεγχος RNA.....	58
2.13.1 Απομόνωση RNA	58
2.13.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)	58
2.14 Ανοσοϊστοχημεία	59
2.15 Στατιστική ανάλυση	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3.1 Αναγνώριση του μεσοδερματικού πληθυσμού που ανταποκρίνεται στον VEGF και οδηγεί σε EPC	63
3.1.1 Η πλειονότητα των EPC προέρχεται από μεσοδερματικά κύτταρα που εκφράζουν τον VEGFR2.....	65
3.2 Μελέτη της μεταγωγής του σήματος του VEGF στον συνολικό-μεικτό μεσοδερματικό πληθυσμό που οδηγεί σε EPC κατά τη διαφοροποίηση των hESC σε EC.....	67

3.2.1 Ο VEGF επάγει τη φωσφορυλίωση γνωστών καθοδικών στη μεταγωγή του σήματος πρωτεϊνών	67
3.2.2 Ο VEGF επάγει τη μεταγραφή χαρακτηριστικών γονιδίων της ενδοθηλιακής σειράς κατά τη μετάβαση των μεσοδερματικών κυττάρων σε EPC.....	68
3.3 Διαφοροποίηση των hPSC σε δύο διακριτούς φαινότυπους των SMC.....	70
3.3.1 Διαφοροποίηση των hPSC προς τον συστατικό φαινότυπο των SMC.....	70
3.3.2 Διαφοροποίηση των hPSC προς τον συνθετικό φαινότυπο των SMC.....	73
3.4 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC <i>in vitro</i>	79
3.4.1 Τα hPSC-cSMC εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση σε σχέση με τα hPSC-sSMC	79
3.4.2 Τα hPSC-cSMC χαρακτηρίζονται από μειωμένη εναπόθεση συστατικών της ECM και ενεργότητα MMP σε σχέση με τα hPSC-sSMC.....	80
3.4.3 Τα hPSC-cSMC και hPSC-sSMC εμφανίζουν χαρακτηριστικά ολιγοδυναμίας	82
3.5 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC λειτουργούν ως MC <i>in vitro</i>	83
3.5.1 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC συμμετέχουν και σταθεροποιούν το ενδοθηλιακό δίκτυο σε μία <i>in vitro</i> δοκιμασία αγγειογένεσης.....	83
3.5.2 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC επάγουν την οργάνωση των EC σε δίκτυο όταν συγκαλλιεργούνται σε 2D	86
3.6 Δημιουργία 3D δομών (αγγειακών οργανοειδών) αποτελούμενων από hPSC-SMC και EC.....	89
3.6.1 Τα hPSC-cSMC/sSMC διατηρούν σταθερό τον φαινότυπό τους όταν είναι οργανωμένα με τα EC σε αγγειακά οργανοειδή.....	91
3.6.2 Τα hESC-cSMC/sSMC επηρεάζουν τον φαινότυπο των EC στα αγγειακά οργανοειδή.....	92
3.7 Λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών <i>in vitro</i>	94
3.7.1 Τα αγγειακά οργανοειδή δημιουργούν σε υδρογέλες εκβλαστήσεις στις οποίες συμμετέχουν τόσο τα hPSC-cSMC/sSMC όσο και τα EC	94
3.7.2 Τα hPSC-sSMC:EC αγγειακά οργανοειδή σχηματίζουν μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με τα hPSC-cSMC:EC	97
3.8 Η λειτουργικότητα των hESC-cSMC, hESC-sSMC <i>in vivo</i>	103
3.8.1 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC δεν επάγουν την αγγειογένεση όταν χορηγούνται μόνα τους.....	103
3.8.2 Ταχύτερο και πιο ώριμο δίκτυο σχηματίζεται μετά τη συγχρόνηση hESC-SMC και EC σε σχέση με τη χορήγηση μόνο EC.....	103
3.9 Η λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών <i>in vivo</i>	104
3.9.1 Τα αγγειακά οργανοειδή/σφαιροειδή οδηγούν σε ταχύτερη ανάπτυξη ενός δικτύου σε σχέση με τα μονήρη κύτταρα.....	104

3.9.2 Τα αγγειακά οργανοειδή οδηγούν σε ταχύτερη ανάπτυξη ενός ώριμου δικτύου σε σχέση με τα σφαιροειδή EC	104
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	109
4.1 Μελέτη της μεταγωγής του σήματος του VEGF στον μεσοδερματικό πληθυσμό που οδηγεί σε EPC κατά τη διαφοροποίηση των hESC σε EC	109
4.2 Διαφοροποίηση των hPSC σε δύο διακριτούς φαινότυπους των SMC	111
4.3 Δημιουργία 3D δομών (αγγειακών οργανοειδών) αποτελούμενων από hPSC-SMC και EC	114
4.4 Λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών <i>in vivo</i>	116
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	121
SUMMARY	123
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	129

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Αναγεννητική Ιατρική (AI) είναι ένας διεπιστημονικός τομέας έρευνας και κλινικών εφαρμογών που έχει ως στόχο την επιδιόρθωση, την αντικατάσταση ή την αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων που δυσλειτουργούν ή έχουν καταστραφεί λόγω ασθενειών, γενετικών νοσημάτων ή και τραυμάτων [1]. Η χημεία αποτέλεσε τη βάση της σύνθεσης νέων φαρμάκων και το νυστέρι ήταν ο ακρογωνιαίος λίθος της χειρουργικής. Η AI είναι ένα αναδυόμενο αντικείμενο που υπόσχεται τη ριζική (αιτιολογική) αντιμετώπιση μιας σειράς νόσων και για αυτόν ακριβώς τον λόγο, η νέα αυτή κατεύθυνση στην ιατρική πρόκειται σύντομα να αποτελέσει την τρίτη θεραπευτική «αρχή», μετά τη χειρουργική και τη φαρμακευτική θεραπεία. Χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό αρκετών τεχνολογικών προσεγγίσεων που τη μεταφέρει πέρα από τις παραδοσιακές θεραπείες μεταμόσχευσης και αποκατάστασης. Αυτές οι προσεγγίσεις μπορεί να περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται, τη χρήση διαλυτών μορίων, τη γονιδιακή θεραπεία, τη μεταμόσχευση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων (Stem cells, SC), τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων και τη μηχανική ιστών (MI, tissue engineering) [2],[3].

Νοσήματα και παθολογικές καταστάσεις που αποτελούν θεραπευτικούς στόχους της AI είναι μεταξύ πολλών άλλων η σκλήρυνση κατά πλάκας, εκφυλιστικά νοσήματα του νευρικού συστήματος, όπως η νόσος του Parkinson's, η νόσος Alzheimer, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, ο σακχαρώδης διαβήτης, η οστεοαρθρίτιδα, μυϊκές διαταραχές, η νόσος του Crohn, κακοήθεις όγκοι, ηπατικές νόσοι, οφθαλμολογικές παθήσεις, καρδιοπάθειες, αλλά και σοβαρά τραύματα οστών και εγκαύματα.

Στο επίκεντρο της AI είναι τα SC. Η χρήση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Embryonic Stem Cells, ESC) και μετέπειτα των επαναπρογραμματισμένων βλαστικών κυττάρων (induced pluripotent stem cells-iPSC) επέφερε μια επανάσταση στον τομέα αυτό. Τα κύτταρα αυτά, έχοντας ένα ανεξάντλητο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλους τους τύπους κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα αναγέννησης όλων των ιστών του σώματος. Ιδιαίτερα τα iPSC, ξεπερνώντας ηθικά διλήμματα και περιορισμούς μιας πιθανής ανοσολογικής απόρριψης είναι πλέον στο στάδιο της κλινικής εφαρμογής. Τα κύτταρα αυτά έχουν

προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με πολύ μεγάλα ποσά να επενδύονται κάθε χρόνο στην έρευνα γύρω από αυτά και με φορείς να ιδρύονται με στόχο να εξασφαλίσουν την ορθή χρήση τους [4].

Η MI ξεπερνώντας πλέον τους περιορισμούς των τυπικών δισδιάστατων (2 dimensional, 2D) κυτταρικών καλλιιεργειών και σε συνδυασμό με τη χρήση των κατάλληλων ικριωμάτων (scaffolds), τη διαφοροποίηση και την οργάνωση των κυττάρων σε τρισδιάστατες (3 dimensional, 3D) δομές, έρχεται ένα βήμα πιο κοντά στη φυσιολογία του προς αναγέννηση ιστού [5].

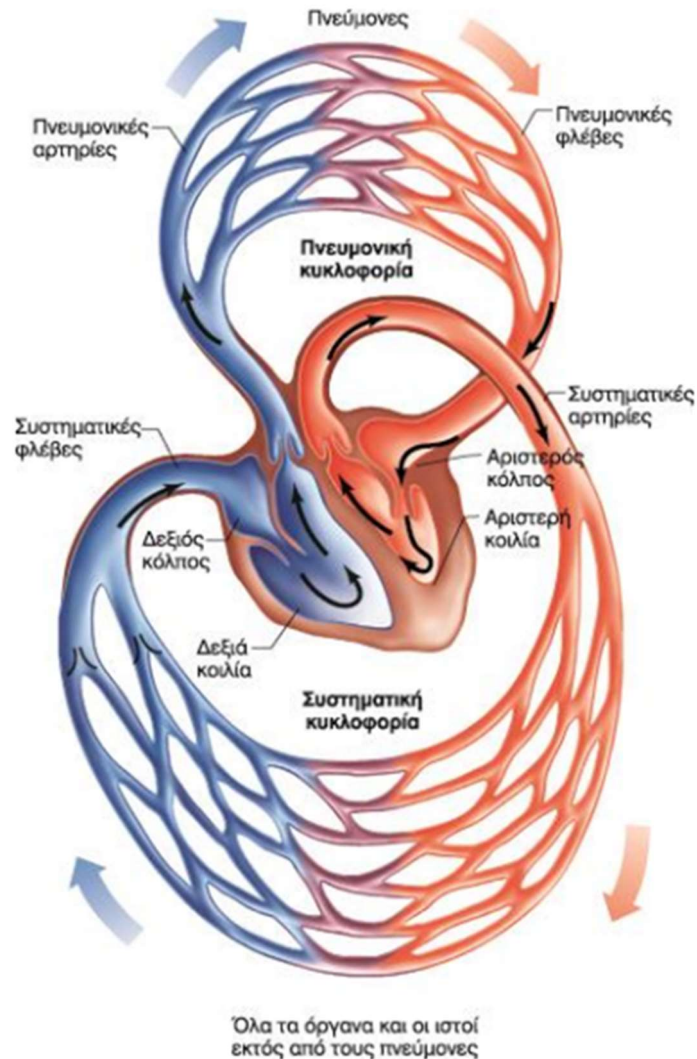
Πέραν όμως από τη ραγδαία ανάπτυξη που γνωρίζει ο τομέας αυτός, ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια που αντιμετωπίζει κατά την αναγέννηση παχύτερων και μεταβολικά απαιτητικών οργάνων, όπως ο καρδιακός μυς, οι σκελετικοί μύες και το ήπαρ, παραμένει η αγγειογένεση/αγγειοποίηση. Όταν το μέγεθος του προς αναγέννηση ιστού είναι άνω των 100-200μm, υπερβαίνεται η ικανότητα τροφοδοσίας θρεπτικών ουσιών και απομάκρυνσης των αποβλήτων μέσω διάχυσης με αποτέλεσμα να απαιτείται η εξασφάλιση παροχής διαμέσου ενός αγγειακού δικτύου [6],[7]. Συνήθως, όμως, για να αγγειωθεί πλήρως ένα μη αγγειωμένο ικρίωμα *in vivo* χρειάζονται αρκετές εβδομάδες [8]. Χωρίς, όμως, άμεση και λειτουργική αγγείωση των χορηγούμενων μοσχευμάτων, η πλειοψηφία των κυττάρων που φέρουν αποτυγχάνει να επιβιώσει στην πρόιμη φάση μετά τον ενοφθαλμισμό. Ως εκ τούτου, έχει καταστεί επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας αγγειωμένων τεχνητών ιστών, που θα εξασφαλίζουν την ταχύτατη αιμάτωση του εμφυτεύματος, μέσω της αναστόμωσης των αγγείων του με αυτά του οργανισμού/δέκτη, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη βιωσιμότητα και την εύρυθμη λειτουργία του. Κατά συνέπεια, ο τομέας της MI που έχει αναδυθεί και υφίσταται ταχεία ανάπτυξη είναι αυτός της μηχανικής των αγγείων των ιστών (Vascular Tissue Engineering), ο οποίος περιλαμβάνει τη δημιουργία τόσο μεγάλων όσο και μικρών αγγείων και τριχοειδών.

1.1 Τα αιμοφόρα αγγεία και τα κύτταρα που τα απαρτίζουν

Το αγγειακό σύστημα αποτελεί τη μεγαλύτερη επιφάνεια στο σώμα μας, που χρησιμεύει ως κρίσιμη διεπαφή μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και των διαφορετικών οργάνων/ιστών. Σε ένα ενήλικο άτομο αν όλα αυτά τα αγγεία ευθυγραμμίζονταν θα εκτείνονταν σε μήκος 96.000km [9], δηλαδή, όσο δύομισι

φορές η περιφέρεια της Γης. Τα αιμοφόρα αγγεία δεν είναι απλοί “αγωγοί” αλλά, αντιθέτως, δυναμικοί αυλοί διαφόρων μεγεθών και δομών που συνδέονται σχηματίζοντας ένα λειτουργικό δίκτυο. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου σε όλα τα κύτταρα των ιστών, καθώς και των θρεπτικών συστατικών και η απομάκρυνση των μεταβολικών αποβλήτων των κυττάρων, όπως και του διοξειδίου του άνθρακα [10]. Η θερμορύθμιση και η διατήρηση της ομοιόστασης στον οργανισμό εμπεριέχονται, επίσης, στις λειτουργίες του καρδιαγγειακού συστήματος. Η γρήγορη ροή αίματος σε ολόκληρο το σώμα παράγεται από την πίεση που δημιουργείται από τη λειτουργία της καρδιάς ως αντλία. Στο συστηματικό κύκλωμα το αίμα αντλείται από την αριστερή κοιλία και μεταφέρεται μέσω μιας μεγάλης αρτηρίας, της αορτής, σε μικρότερες αρτηρίες, οι οποίες διακλαδίζονται στα μικρότερα αρτηρίδια και από εκεί σε έναν τεράστιο αριθμό τριχοειδών, τα οποία στη συνέχεια συνενώνονται για να σχηματίσουν αγγεία μεγαλύτερης διαμέτρου, τα φλεβίδια [9]. Τα φλεβίδια με τη σειρά τους ενώνονται σχηματίζοντας μεγαλύτερες φλέβες και τελικά η κάτω κοίλη φλέβα, η οποία συλλέγει το αίμα από το κάτω μέρος του σώματος και η άνω κοίλη φλέβα, που συλλέγει το αίμα από το άνω ήμισυ του σώματος επιστρέφουν το αίμα στον δεξιό κόλπο. Με ένα παρόμοιο κύκλωμα κατά την πνευμονική κυκλοφορία το αίμα μεταφέρεται από τη δεξιά κοιλία μέσω μιας αρτηρίας και μέσω μικρότερων αρτηριών, αρτηριδίων και τριχοειδών στους πνεύμονες, όπου προσλαμβάνει οξυγόνο και στη συνέχεια μέσω των φλεβιδίων, των μεγαλύτερων φλεβών και τελικά τεσσάρων φλεβών φτάνει στον αριστερό κόλπο [9] (Εικόνα 1.1).

Σε κάθε δεδομένη στιγμή περίπου το 5% του συνολικού αίματος που κυκλοφορεί ρέει μέσω των τριχοειδών, εκτελώντας τη βασική λειτουργία ολόκληρου του καρδιαγγειακού συστήματος: την προμήθεια θρεπτικών ουσιών στους ιστούς και την απομάκρυνση τελικών προϊόντων του μεταβολισμού από αυτούς [9]. Ως αποτέλεσμα, χαρακτηρίζονται από μία μεγάλη αναλογία της επιφάνειας προς τον όγκο. Τα τριχοειδή είναι τα πιο άφθονα αγγεία στο σώμα μας [9]. Αποτελούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial cells, EC) που περιβάλλονται από μία βασική μεμβράνη και ένα στρώμα περικυττάρων (Pericytes, PC), που είναι ενσωματωμένο

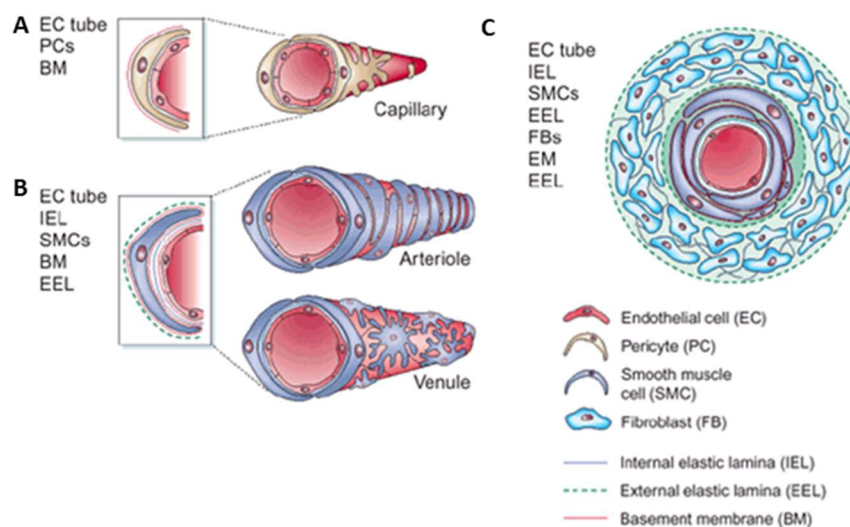


Εικόνα 1.1 Η συστηματική και η πνευμονική κυκλοφορία. Όπως απεικονίζεται με την αλλαγή του χρώματος από μπλε σε κόκκινο, το αίμα είναι πλήρως οξυγονωμένο καθώς ρέει διαμέσου των πνευμόνων και μετά χάνει κάποια ποσότητα οξυγόνου (κόκκινο προς μπλε) καθώς ρέει διαμέσου των άλλων οργάνων και ιστών. Για λόγους απλούστευσης οι αρτηρίες και οι φλέβες που αφήνουν την καρδιά και επιστρέφουν σε αυτή απεικονίζονται ως μονά αγγεία, κάτι που ισχύει για τις αρτηρίες, αλλά όχι για τις φλέβες.

στη βασική μεμβράνη. Τα αρτηριόλια και τα φλεβίδια έχουν αυξημένη κάλυψη με τοιχωματικά κύτταρα (Mural Cells, MC) σε σύγκριση με τα τριχοειδή. Τα αρτηριόλια επενδύονται πλήρως με αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vascular Smooth Muscle Cells, vSMC), που σχηματίζουν τη δική τους βασική μεμβράνη και είναι τοποθετημένα περιφερειακά, στενά συνδεδεμένα τόσο μεταξύ τους όσο και με το ενδοθήλιο [11]. Η εξαγγείωση των μακρομορίων και των κυττάρων από τη ροή του αίματος συμβαίνει συνήθως από τα φλεβίδια που βρίσκονται μετά τα τριχοειδή (postcapillary). Τα τοιχώματα των μεγαλύτερων αγγείων αποτελούνται από τρεις εξειδικευμένες

στιβάδες: την εσωτερική που αποτελείται από τα EC, τη μεσαία που αποτελείται από τα λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells, SMC) και την εξωτερική που αποτελείται από έναν “χιτώνα” ινοβλαστών, μαζί με εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) και ελαστικό έλασμα (elastic laminae) και έχει τη δική της παροχή αίματος, γνωστή ως vasa vasorum (το αγγείο των αγγείων), που εκτείνεται εν μέρει στη μεσαία [11] (Εικόνα 1.2).

Ωστόσο, παρά τη μεγάλη πολυπλοκότητα και ετερογένεια των διαφόρων τύπων αγγείων, είναι εντυπωσιακό ότι όλα έχουν δύο κοινούς δομικούς λίθους: τα EC και τα MC (PC και SMC).



Εικόνα 1.2 Η δομή των αγγείων. Α. Τα τριχοειδή αποτελούνται από EC που περιβάλλονται από μία βασική μεμβράνη και ένα στρώμα PC. **Β.** Στα αρτηριόλια και τα φλεβίδια ο αυλός των EC περιβάλλεται από τη βασική μεμβράνη και τα SMC. **Γ.** Τα μεγάλα αγγεία αποτελούνται από τρεις εξειδικευμένες στιβάδες, όπου τα EC περιβάλλονται από τη βασική μεμβράνη, τα SMC, τους ινοβλάστες και το ελαστικό έλασμα [11].

1.1.1 Τα ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα EC σχηματίζουν μία λεπτή μονοστιβάδα, καλούμενη ενδοθήλιο, στην εσωτερική επιφάνεια των αγγείων και έρχονται σε επαφή με τα συστατικά και τα κύτταρα του αίματος. Από την πρώτη περιγραφή το 1865 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1970 αυτή η μονοστιβάδα θεωρούνταν ένα απλό αδρανές φράγμα, που διαχωρίζει το αίμα από τον περιβάλλοντα ιστό. Ωστόσο, το ενδοθήλιο, πέραν του ότι δρα ως επιλεκτικός φραγμός της διέλευσης συστατικών και αερίων μεταξύ του αυλού και των γύρω ιστών, κατέστη σαφές ότι είναι ένα ενεργό μεταβολικό και ενδοκρινικό όργανο [10], [12]. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης η παρουσία των EC σε νεοδημιουργηθέντα

όργανα επάγει σήματα για την προώθηση της οργανογένεσης, ακόμη και απουσία της αιματικής ροής [13]. Το ενδοθήλιο έχει πολλές λειτουργίες, ορισμένες από τις οποίες είναι εξειδικευμένες με βάση τη θέση του και για το λόγο αυτό παρουσιάζει μία σημαντική φαινοτυπική ετερογένεια κατά μήκος του αγγειακού δικτύου [10]. Ελέγχει ενεργά τον βαθμό αγγειακής χαλάρωσης/συστολής, την εξαγγείωση ουσιών, υγρών, ορμονών και μακρομορίων, καθώς και των αιμοπεταλίων και των κυττάρων του αίματος, συνεισφέροντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών [10],[12]. Ο φαινότυπος των EC μπορεί να ποικίλει μεταξύ: 1) διαφορετικών οργάνων, 2) διαφόρων περιοχών της κυκλοφορίας του αίματος μέσα στο ίδιο όργανο και 3) γειτονικών EC των αιμοφόρων αγγείων του ίδιου οργάνου.

Παρά την ετερογένεια που εμφανίζουν τα EC, εκφράζουν πρωτεϊνικούς δείκτες που τα χαρακτηρίζουν και τα διακρίνουν από οποιαδήποτε άλλα κύτταρα. Μερικοί από αυτούς εκφράζονται καθολικά, ενώ άλλοι εκφράζονται μόνο μετά από ενεργοποίηση από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (inflammatory cytokines), ή αυξητικούς παράγοντες, ή εκφράζονται σε EC που επιτελούν μια εξειδικευμένη διεργασία. Ακολουθούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών.

Το CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που εκφράζεται σε πρώιμα και ώριμα αγγειακά EC [14]. Το αντι-CD31 είναι ο πιο ευαίσθητος διαθέσιμος παν-ενδοθηλιακός δείκτης. Η εύρεση του μεταξύ δύο παρακείμενων EC καθιστά αυτό το μόριο προσκόλλησης μέρος της ενδοθηλιακής διακυτταρικής σύνδεσης, που ενισχύει τις ιδιότητες του ενδοθηλιακού φραγμού.

Η Vascular endothelial (VE)-cadherin είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπεροικογένειας των καντχερινών (cadherins), που εντοπίζεται στις συνδέσεις μεταξύ των EC και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας. Οι συνδέσεις μεταξύ των EC δε διατηρούν μόνο τη διακυτταρική προσκόλληση, αλλά διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο και στη μεταφορά ενδοκυτταρικών σημάτων, που ρυθμίζουν την επαφή, την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, την πολικότητα των κυττάρων, την αυλοποίηση και τις αλληλεπιδράσεις με τα MC [15]. Επομένως, οι συνθήκες που διαταράσσουν τις συνδέσεις των EC όχι μόνο αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα ανοίγοντας

μεσοκυτταρικά κενά αλλά, επίσης, αλλάζουν τις αποκρίσεις των EC στο περιβάλλον τους και στα γύρω κύτταρα.

Ο δείκτης CD34 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε εξειδικευμένα EC. Αυτά είναι τα κύτταρα κορυφής (tip cells), που εντοπίζονται στο καθοδηγητικό άκρο της αγγειακής εκβλάστησης των κυττάρων, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης (Ενότητα 1.2.2). Αντίστοιχα, εκφράζεται σε ένα μικρό υποσύνολο των EC κατά την καλλιέργειά τους *in vitro* [16]. Επίσης, αποτελεί δείκτη των προγονικών EC. Τέλος, είναι δείκτης και μιας άλλης διακριτής ομάδας κυττάρων, των αιμοποιητικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων (Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, HSPC), τα οποία εντοπίζονται στο μυελό των οστών και στην κυκλοφορία του αίματος καθόλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κάθε τύπο ώριμων κυττάρων του αίματος (blood cells) [17].

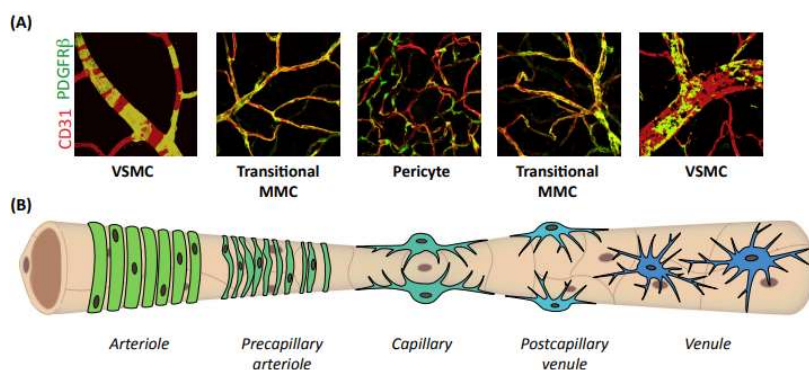
Γενικά, τα EC είναι μία καλά χαρακτηρισμένη ομάδα κυττάρων τόσο ως προς τους πρωτεϊνικούς δείκτες που τα διακρίνουν όσο και ως προς τις λειτουργίες τους. Το γεγονός αυτό είχε ως συνέπεια η τρέχουσα κλασική προσέγγιση για τη δημιουργία μιας αγγειωμένης ιστικής κατασκευής να βασιστεί στην απομόνωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μεταφορά των EC σε ένα κατάλληλο ικρίωμα, πριν από την εμφύτευση *in vivo* [18]. Ωστόσο, παρόλο που τα εμφυτεύματα που φέρουν EC *in vivo* είναι ικανά να σχηματίσουν ένα ανώριμο αγγειακό δίκτυο, η αναποτελεσματική αναστόμωση αυτού του δικτύου με το αγγειακό σύστημα του ξενιστή προκαλεί υποστροφή των αγγείων του μοσχεύματος εντός μερικών ημερών [19],[20]. Επιπλέον, τα παραγόμενα τριχοειδή αγγεία είναι διαρρέοντα και λόγω της αυξημένης διαπερατότητας, συμβάλλουν στην ανάπτυξη οιδήματος των ιστών [21],[22]. Ως εκ τούτου, μια ιδιαίτερη πρόκληση στο πεδίο της MI παραμένει η δημιουργία αγγειωμένων ιστικών κατασκευών, με εύρυθμη λειτουργία των αγγείων. Για να επιτευχθεί αυτό φαίνεται πως η παρουσία και των δύο κυτταρικών τύπων που συνθέτουν ένα αγγείο (EC και MC) είναι απαραίτητη προϋπόθεση.

1.1.2 Τα τοιχωματικά κύτταρα

Τα MC είναι κυρίως υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση, την αναστολή της υποστροφής, τη σύσπαση του αγγείου καθώς και την παραγωγή και εναπόθεση πρωτεϊνών της

ECM [23],[24]. Η δυσλειτουργία ή η απώλεια των MC έχουν συνδεθεί με πολλαπλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, της νεφροπάθειας, της ίνωσης και της ανάπτυξης των όγκων [25]. Οι αλληλεπιδράσεις τους με τα EC στο αγγειακό τοίχωμα, ενώ δεν είναι πλήρως κατανοητές ακόμη [26],[27],[28], είναι καθοριστικές για την ανάπτυξη, την ωρίμανση, την αναδιαμόρφωση και τη λειτουργία των αγγείων, επηρεάζοντας και τους δύο τύπους κυττάρων.

Τα MC είναι ένας ετερογενής κυτταρικός πληθυσμός που αποτελείται από ποικίλους κυτταρικούς φαινότυπους, με μεγάλη πλαστικότητα, οι οποίοι κατανέμονται κατά μήκος του αγγειακού δικτύου. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών φαινότυπων των MC σχετίζονται με τον ιστό, το στάδιο ανάπτυξης, τη διάμετρο του αγγείου και την κατάσταση του αγγειακού συστήματος. Ακόμα και μέσα στο ίδιο αγγείο παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των υποπληθυσμών των MC. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα μπορεί να ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ως προς τη μορφολογία και την πρωτεϊνική έκφραση ανάλογα με την ανατομική θέση τους, βάσει της οποίας μπορούν να εμφανίσουν και ορισμένες λειτουργικές διαφορές [29]. Τα MC διακρίνονται, κυρίως με βάση τη θέση τους, στα vSMC που περιβάλλουν τα μεγαλύτερα αγγεία, όπως αρτηρίες και φλέβες και στα PC, που τυπικά περιβάλλουν μικρότερα αγγεία (10–100μm διάμετρος) και τριχοειδή (<10μm διάμετρο) [30],[31] (Εικόνα 1.3). Ωστόσο, η ύπαρξη μεταβατικών φαινότυπων των MC μεταξύ των αρτηριδίων και των φλεβιδίων που βρίσκονται πριν από τα τριχοειδή με τα τριχοειδή [32] έχει πρόσφατα προταθεί στη βιβλιογραφία [25].



Εικόνα 1.3 Κατανομή των MC στο αγγειακό δίκτυο. Α. Εικόνες υψηλής ανάλυσης από συνεστιακό μικροσκόπιο απεικονίζουν τα MC (χρώση έναντι του δείκτη PDGFRβ, πράσινο χρώμα) στους διάφορους τύπους αγγείων που απαντώνται σε έναν οργανισμό. Με κόκκινο φαίνονται τα EC (χρώση έναντι του δείκτη CD31) που συνθέτουν τον αυλό των αγγείων, όπως

αυτά αναπτύχθηκαν σε ποντίκια. **B.** Σχηματική απεικόνιση του μικροαγγειακού συνεχούς των MC από το αρτηρίδιο έως το φλεβίδιο [25].

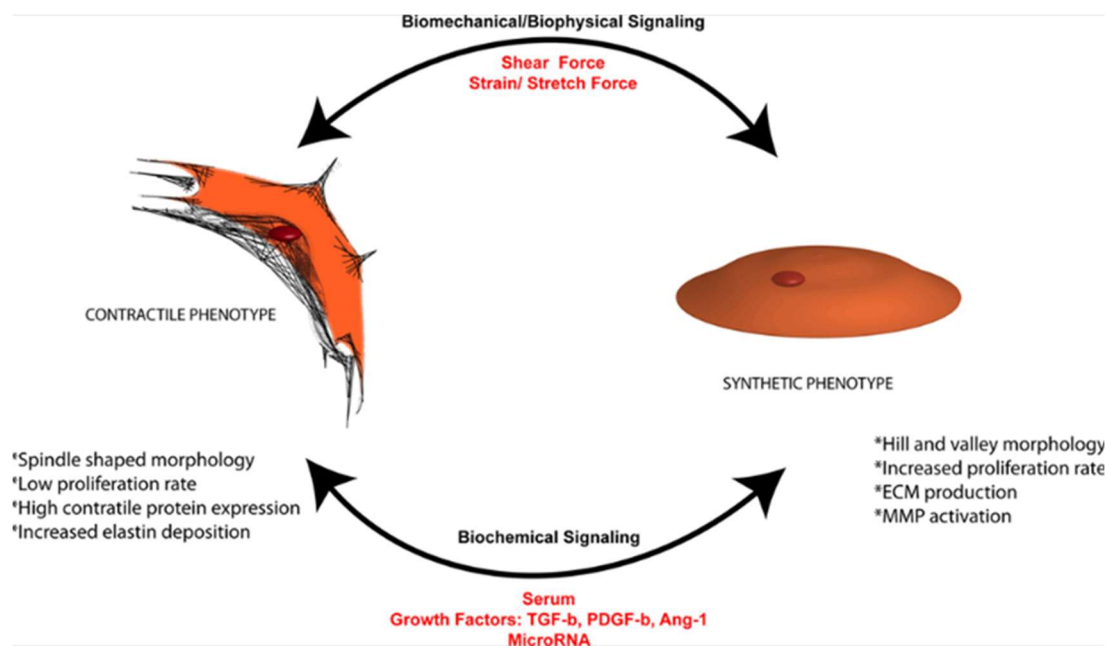
1.1.2.1 Τα λεία μυικά κύτταρα (SMC)

Τα SMC είναι κύτταρα με μεγάλη πλαστικότητα, ωστόσο τουλάχιστον δύο διακριτοί φαινότυποι έχουν περιγραφεί λεπτομερώς: ο συσταλτικός (contractile, cSMC) και ο συνθετικός (synthetic, sSMC). Και οι δύο φαινότυποι συμμετέχουν στη δημιουργία αγγείων, αλλά τα sSMC κυριαρχούν στο έμβρυο [33], καθώς και σε τραυματισμένα ή νοσούντα αγγεία, όπως για παράδειγμα σε ασθένειες με αθηροσκληρωτικές πλάκες, ενώ σε ενήλικα υγιή αιμοφόρα αγγεία κυριαρχούν τα cSMC, αναλαμβάνοντας τη σταθεροποίηση των αγγείων [34]. Λόγω αυτής της διαφορετικής εντόπισής τους, που είναι συνυφασμένη με τις επιμέρους δράσεις τους, εμφανίζουν κάποιες διαφορές ως προς τον φαινότυπο και τις λειτουργίες τους. Στις διαφορές αυτές βασίζεται και ο διαχωρισμός τους, καθώς όπως αναφέρθηκε δεν υπάρχει ένας μόνο δείκτης χαρακτηριστικός του κάθε τύπου κυττάρων.

Η κύρια λειτουργία των cSMC, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, είναι η σύσπαση. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από ατρακτοειδή (spindleshaped) μορφολογία, χαμηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα και αυξημένη έκφραση συσταλτικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες alpha smooth muscle actin (α SMA), Smooth muscle 22-alpha (SM22 α), calponin και smoothelin, των οποίων η έκφραση μπορεί να μεταβάλλεται ελαφρώς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης [35]. Ο δείκτης που ορίζει την ωριμότητα των κυττάρων αυτών είναι η smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), μια πρωτεΐνη που ενισχύει τη συσταλτική ικανότητα των κυττάρων. Οι δύο ισομορφές της SMMHC (SM-1 και SM-2) αποτελούν δείκτες των vSMC. Η ισομορφή SM-1 απαντάται κυρίως στον εμβρυϊκό ιστό, ενώ οι ισομορφές SM-1 και SM-2 υπάρχουν στα SMC των ενηλίκων [36]. Επίσης, η έκφραση της ελαστίνης, μιας πρωτεΐνης της ECM που παρέχει στα αιμοφόρα αγγεία ελαστικότητα και ανθεκτικότητα εντοπίζεται στα cSMC [37],[38]. Όπως έχει δειχθεί σε ποντίκια όπου είχε αποσιωποηθεί η έκφρασή της (Eln $^{-/-}$), η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης, στη ρύθμιση της μετανάστευσης και στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των SMC [38]. Ο συνθετικός φαινότυπος των SMC χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μειωμένη έκφραση των συσταλτικών πρωτεϊνών, απουσία έκφρασης

της πρωτεΐνης SMMHC και έκφραση της vimentin [35]. Τα sSMC παράγουν πρωτεΐνες της ECM, όπως η φμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο και εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα μεταλλοπρωτεϊνών (Metalloproteinases, MMPs), συμβάλλοντας στη μετανάστευσή τους [39]. Μετά από πρόκληση τραύματος σε αρτηρίες ποντικών, στα οποία είχε αποσιωπηθεί η έκφραση της MMP9^{-/-}, τα SMC που συλλέχθηκαν από την αρτηρία εμφάνιζαν σημαντικά μειωμένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση [40].

Αν και είναι γνωστό ότι κατά την *in vitro* καλλιέργεια τα SMC χάνουν τις συσταλτικές τους ιδιότητες και υιοθετούν έναν συνθετικό φαινότυπο [35], η κατανόηση του γεγονότος αυτού σε μοριακό επίπεδο και ο χειρισμός των κυττάρων αυτών είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που θα επιτρέψει τη μελέτη της σύνθετης συμπεριφοράς των SMC και την κατανόηση των πολύπλευρων λειτουργιών τους. Ο ορός, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες (όπως TGFβ1, PDGF, ηπαρίνη) και microRNA (miR) έχουν γίνει ευρέως διαδεδομένοι ρυθμιστές των ιδιοτήτων των MC που επηρεάζουν τη μετάβασή τους από τον έναν φαινότυπο στον άλλο *in vitro* [41].



Εικόνα 1.4 Φαινοτυπική πλαστικότητα των SMC. Τα χαρακτηριστικά του συνθετικού και συσταλτικού φαινότυπου των SMC, συμπεριλαμβανομένης της μορφολογίας, του πολλαπλασιασμού, της έκφρασης πρωτεϊνών της ECM και των συσταλτικών πρωτεϊνών. Η μετάβαση στον εκάστοτε φαινότυπο μπορεί ρυθμιστεί από βιοχημικούς και βιομηχανικούς παράγοντες [42].

1.1.2.11 Τα περικύτταρα (PC)

Τα PC ορίζονται μορφολογικά ως κύτταρα εντός της βασικής μεμβράνης των αγγείων, που εκτείνονται κατά τον επιμήκη άξονα των τριχοειδών και περιτυλίγονται γύρω από τα EC [43]. Μπορούν να εμφανίσουν διαφορές ως προς το σχήμα, το μέγεθος και την κατανομή τους [30]. Επικοινωνούν με τα EC με άμεση φυσική επαφή, αλλά και μέσω παρακρινικής σηματοδότησης [43]. Η κάλυψη των αγγείων με PC είναι μερική και ποικίλει με βάση την τοποθεσία τους συμβάλλοντας, επίσης, στην ετερογένειά τους. Η αναλογία PC προς EC διαφέρει ανάλογα με τη λειτουργία, την αρτηριακή πίεση, τον ρυθμό ροής του αίματος [44],[45] και την ορθοστατική αρτηριακή πίεση (μεγαλύτερη κάλυψη υπάρχει στα κάτω άκρα) [31],[46]. Στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο εντοπίζεται η υψηλότερη αναλογία PC:EC (1:1), λόγω του αίματο-αμφιβληστροειδικού και αίματο-εγκεφαλικού φραγμού. Η αναλογία στο δέρμα και τους πνεύμονες είναι 1:10 και στους σκελετικούς μυς είναι η χαμηλότερη που έχει παρατηρηθεί, 1:100. Συνολικά, αυτές οι παρατηρήσεις συνάδουν με τον ρόλο τους στη ρύθμιση της διαπερατότητας των EC, του πολλαπλασιασμού και της σταθερότητας των αγγείων. Η μη κάλυψη των τριχοειδών με PC έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλατωματικών αγγείων, όπως για παράδειγμα κατά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και τον καρκίνο [47].

Τα PC έχουν χαρακτηριστικά ολιγοδυναμίας [48],[49]. Μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, ενώ σε περιπτώσεις διεύρυνσης των αγγείων ή αναδιαμόρφωσης μπορούν να διαφοροποιηθούν σε SMC [50]. Κατά την επούλωση τραυμάτων (wound healing) και σε φλεγμονώδεις διεργασίες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ινοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο τύπου-I [51]. Επίσης, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα σκελετικών μυών [52],[53]. Φαινοτυπικά δεν υπάρχει ένας δείκτης που να χαρακτηρίζει όλα τα PC. Συνήθως, ο χαρακτηρισμός τους περιλαμβάνει την έκφραση της πρωτεογλυκάνης neural/glial anti-gen 2 (NG2), του platelet-derived growth factor receptor-β (PDGFRβ) και του CD146 μαζί με μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως οι CD90 και CD105 και ταυτόχρονη απουσία του CD56, επιφανειακού αντιγόνου που εκφράζεται σε νευρώνες, γλοία και σκελετικούς μυς καθώς και των αιματοποιητικών και ενδοθηλιακών δεικτών CD45 και CD31, αντίστοιχα [54].

Η μεγάλη ετερογένεια των MC και η απουσία ενός δείκτη που να τα χαρακτηρίζει έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις δυνατότητες μελέτης τους. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, που υπογραμμίζουν τη φαινοτυπική σταθερότητα και την πλαστικότητα των MC, θα επιτρέψει τη βελτίωση της θεραπευτικής προσέγγισης με τρόπο ειδικό για τον κάθε ιστό. Πάντως, μολονότι ο ρόλος των MC στη δημιουργία αγγειωμένων κατασκευών για θεραπευτικές εφαρμογές είναι αναμφισβήτητος [41],[55], η δυναμική φαινοτυπική τους φύση δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα, κυρίως λόγω περιορισμών που σχετίζονται με την απομόνωσή τους ή και τη φαινοτυπική πλαστικότητα που εμφανίζουν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους *in vitro* [54],[56].

1.1.2.III Προέλευση των MC

Η οργανοτυπική, μοριακή και μορφολογική ετερογένεια των MC μπορεί να οφείλεται και στην προελεύση τους, η οποία ποικίλει τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στον ενήλικο οργανισμό [25]. Η χρήση χιμαιρικών μοντέλων (*chimeras*) για τον εντοπισμό της γενεαλογικής προέλευσης των MC τα τελευταία χρόνια έριξε φως στην εμβρυϊκή προέλευση των κυττάρων αποδεικνύοντας ότι προέρχονται από τις στιβάδες του μεσοδέρματος και του εκτοδέρματος (νευρική ακρολοφία) [25]. Επίσης, φαίνεται ότι η μετέπειτα τοποθεσία τους στον οργανισμό έχει άμεση σχέση με την εμβρυϊκή προέλευσή τους. Οι πρώτες μελέτες που έδειξαν ότι τα MC προέρχονται από μεσοδερματικά κύτταρα, υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός μεσοδερματικού προγονικού αγγειοβλάστη στο αρχέγονο αγγειακό πλέγμα. Τα προγονικά αυτά κύτταρα είναι θετικά για τον VEGFR2 και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε EC έπειτα από επαγωγή με VEGF ή σε MC μετά από επαγωγή με PDGFB (Platelet-Derived Growth Factor B) [57]. Τα MC της κεφαλής και του λαιμού, συμπεριλαμβανομένων όλων των τμημάτων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και του θύμου αδένου προέρχονται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, όπως υποδεικνύεται από μελέτες ανίχνευσης προέλευσης (*lineage-tracing*) [58],[59]. Τα MC των υπόλοιπων ιστών, όπως των εσωτερικών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα [60], του εντέρου [61] και του ήπατος [62] προέρχονται από διακριτούς μεσοδερματικούς πληθυσμούς. Οι πολλαπλές εμβρυϊκές προελεύσεις των MC είναι σε μεγάλο βαθμό

γνωστές. Ωστόσο, η ανάπτυξη των MC κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης των ενηλίκων είναι ελάχιστα κατανοητή. Έχουν προταθεί διαφορετικά σενάρια, χωρίς βέβαια το ένα να αποκλείει το άλλο. Τα MC μπορεί να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται από προϋπάρχοντα (κυρίως στο ΚΝΣ) [31]. Επίσης, ενώ τα SMC και τα PC ταξινομούνται αμφότερα ως MC υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα PC μπορεί να διαφοροποιηθούν σε SMC [63],[64],[48]. Επίσης, τα MC μπορεί να προέρχονται από προγονικά κύτταρα τα οποία διατηρούνται αδιαφοροποίητα στον ενήλικο οργανισμό [48]. Αυτές οι προγονικές “δεξαμενές” καθίστανται δραστικές και χρησιμεύουν ως πηγές αναπλήρωσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια ασθένειας ενός ιστού και επούλωσης τραυμάτων και ως εκ τούτου μελετώνται για το δυναμικό τους σε κυτταρικές θεραπείες. Ο πιο καλά μελετημένος πρόγονος των SMC είναι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSC, μερικές φορές αναφέρονται και ως μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα) [48],[43]. Τα MSC βρίσκονται σε πολλούς ιστούς στο σώμα. Δεδομένου ότι είναι ένας πληθυσμός που, επίσης, δε μπορεί να χαρακτηριστεί από έναν συγκεκριμένο δείκτη, έχουν οριστεί κάποια ελάχιστα κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται, όπως η ικανότητα ολιγοδυναμίας [65]. Αν και η διαφοροποίησή τους σε SMC δεν περιλαμβάνεται στα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τα MSC, αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα τους αυτή [66].

Συμπερασματικά, το καρδιαγγειακό σύστημα ενορχηστρώνει προσεκτικά ένα μωσαϊκό διαφορετικών φαινότυπων των MC που προέρχονται από διαφορετικές εμβρυϊκές και ενήλικες προελεύσεις. Ετερογενείς υποπληθυσμοί MC, διαφορετικής προέλευσης, μπορεί να συνυπάρχουν στο ίδιο αγγείο. Ορισμένες φαινοτυπικές διαφορές των MC μπορεί να εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης, ενώ άλλες μπορεί να αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών υπότυπων των MC. Φαίνεται, λοιπόν, πιθανό ότι το πλήθος των προελεύσεων των MC μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στην οργανοτυπική λειτουργική ετερογένεια και πλαστικότητα τους.

1.2 Η δημιουργία νέων αγγείων

Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο σύστημα οργάνων που αναπτύσσεται κατά τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια [67]. Καθώς το έμβρυο μεγαλώνει πέρα από το

μέγεθος όπου οι βασικές ουσίες μπορούν να μεταφερθούν με απλή διάχυση, ένα δίκτυο αγγείων πρέπει να αναπτυχθεί για να καλύψει τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων ιστών και οργάνων. Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από δύο συγγενείς, αλλά διακριτές διαδικασίες: την **αγγειοποίηση** (vasculogenesis) και την **αγγειογένεση** (angiogenesis). Η αγγειοποίηση περιλαμβάνει τον *de novo* σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από *in situ* διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων [67],[68],[69], ενώ η αγγειογένεση περιλαμβάνει τη δημιουργία νέων αγγείων από προϋπαρχόντα [70]. Στα έμβρυα ο σχηματισμός των αγγείων ξεκινά με τη διαφοροποίηση των αγγειοβλαστών προς ένα πρωτογενές αγγειακό πλέγμα, το οποίο επεκτείνεται περαιτέρω μέσω αγγειογένεσης ή με ένα συνδυασμό αγγειοποίησης και αγγειογένεσης, ανάλογα με το εκάστοτε αναπτυσσόμενο όργανο [67]. Το νεοσυντιθέμενο αγγειακό δίκτυο, σταθεροποιείται στη συνέχεια με την προσέλκυση PC και SMC, τα οποία περιβάλλουν το άωρο αγγείο με μια διαδικασία που ονομάζεται **αγγειακή μυογένεση** (vascular myogenesis). Επίσης, μέσω της αρτηριογένεσης αναδιαμορφώνεται και αυξάνεται η διάμετρος των ήδη υπάρχοντων αγγείων, ώστε να δημιουργηθούν αιμοφόρα αγγεία μεγάλης διαμέτρου.

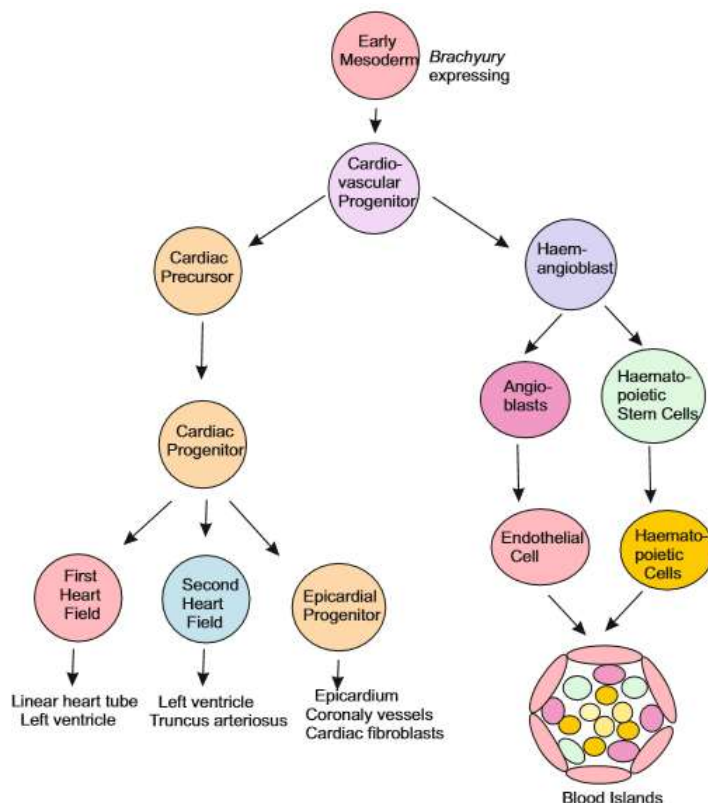
Η αγγειογένεση είναι μια κρίσιμη διαδικασία που φυσιολογικά λαμβάνει χώρα τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όσο και σε ενήλικους οργανισμούς, όπως στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και κατά τη διάρκεια της επούλωσης πληγών [71]. Αδιαμφισβήτητη είναι, επίσης, η σημασία της στην παθογένεση πολλών διαταραχών, όπως η ογκογένεση, η ισχαιμία, οι χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, η αρθρίτιδα και η αμφιβληστροειδοπάθεια [72].

Ομοίως, η αγγειοποίηση παρατηρείται τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στον ενήλικο οργανισμό, μέσω της προσέλκυσης των προγονικών EC (Endothelial Progenitor Cells, EPC) που προέρχονται από των μυελό των οστών (postnatal vasculogenesis). Μέχρι την απομόνωση των κυττάρων αυτών από περιφερικό αίμα και τον χαρακτηρισμό τους [73], περίπου δύο δεκαετίες πριν, θεωρούνταν ότι η αγγειοποίηση συμβαίνει μόνο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η συμβολή των EPC στον σχηματισμό νέων αγγείων υπό διάφορες παθοφυσιολογικές συνθήκες παραμένει αμφιλεγόμενη. Μελέτες αναφέρουν ότι σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [74],[75], συνεισφέρουν έως και 50-90% στα

νεοσχηματιζόμενα αιμοφόρα αγγεία, ενώ άλλες αναφορές υποδηλώνουν μια πολύ μικρή ή ακόμη και καμία συμβολή τους *in vivo* [76],[77].

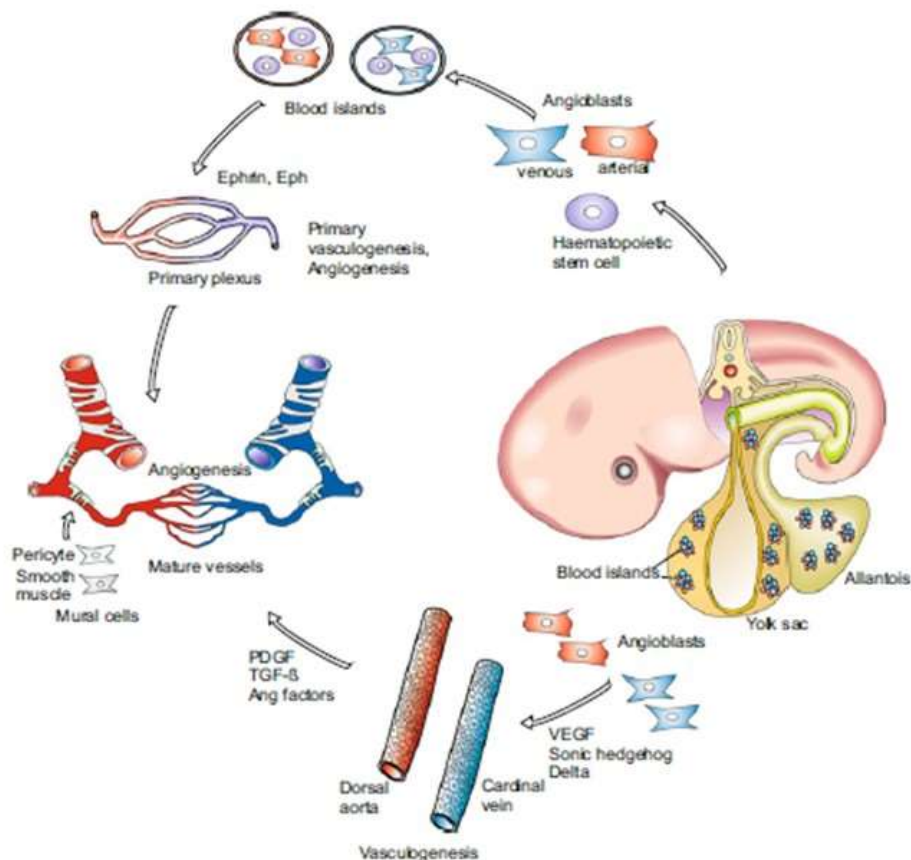
1.2.1 Η αγγειοποίηση (*vasculogenesis*)

Τα αιμοφόρα αγγεία και η καρδιά προκύπτουν από έναν κοινό πρόδρομο. Ένα μεσοδερματικό πληθυσμό κυττάρων (Brachyury+), που διαφοροποιείται είτε σε καρδιακά πρόδρομα κύτταρα είτε σε αιμαγγειοβλάστες. Κατά την αγγειοποίηση οι αιμαγγειοβλάστες διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν αρχικά σε εξωεμβρυϊκές (λεκιθικός σάκος) και σε ενδοεμβρυϊκές θέσεις αγγείωσης, πολλαπλασιάζονται και αθροίζονται, σχηματίζοντας τις νησίδες αίματος (blood islands) [68],[78], από όπου θα ξεκινήσει ο σχηματισμός των τριχοειδών αγγείων. Πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ κυττάρων όσο και μεταξύ κυττάρων και ECM. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές κατευθύνονται χωρικά και χρονικά από αυξητικούς παράγοντες και μορφογόνα [67],[79]. Στην περιφέρεια των νησίδων αυτών εντοπίζονται οι αγγειοβλάστες, που θα δημιουργήσουν τα EC, ενώ το κέντρο τους αποτελείται από τα προγονικά κύτταρα των αιμοποιητικών κυττάρων. Οι αγγειοβλάστες, είναι μια πρώιμη κυτταρική σειρά, όπου ο πρώτος δείκτης που τους χαρακτηρίζει είναι ο VEGFR2, ωστόσο δεν έχουν αποκτήσει όλους τους



Εικόνα 1.5 Προέλευση των κυττάρων που εμπλέκονται στον σχηματισμό του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα αιμοφόρα αγγεία και η καρδιά προκύπτουν από έναν κοινό μεσοδερματικό πρόδρομο, που διαφοροποιείται είτε σε καρδιακά πρόδρομα κύτταρα είτε σε αιμαγγειοβλάστες οι οποίοι τελικά θα οδηγήσουν στη δημιουργία των αιματικών νησίδων.

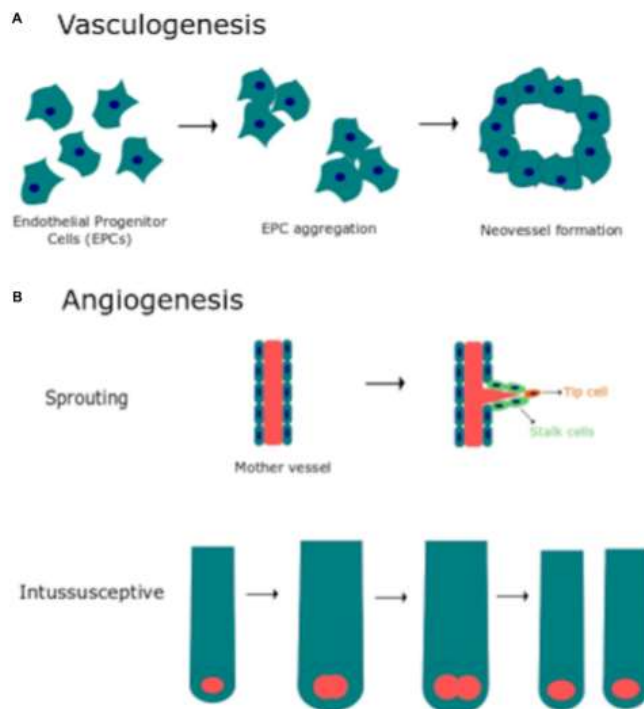
χαρακτηριστικούς δείκτες των EC (όπως VE-cadherin-) και χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή μεταναστευτική ικανότητα [69]. Τα τριχοειδή από γειτονικές νησίδες αίματος συντήκονται για να σχηματίσουν ένα μεγαλύτερο πλέγμα. Η ραχιαία (dorsal) αορτή (πρώτη κύρια αρτηρία) και οι πρώτες κύριες (cardinal) φλέβες διαφοροποιούνται άμεσα από αγγειοβλάστες που μεταναστεύουν κατά μήκος της μέσης γραμμής και όχι μέσω των νησίδων αίματος. Μόλις σχηματιστούν, οι κύριες αρτηρίες κινούνται προς την καρδιά.



Εικόνα 1.6 Σύνοψη των γεγονότων που οδηγούν στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος (αγγειοποίηση). Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μεσοδερματικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς αγγειοβλάστες και EPC σχηματίζοντας εστιακές συναθροίσεις μεσεγχυματικών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως νησίδες αίματος (*blood islands*). Οι νησίδες αίματος, που σχηματίζονται εξωεμβρυϊκά, στον λεκιθικό σάκο, συνενώνονται για να δημιουργήσουν ένα πρωτογενές αγγειακό πλέγμα, που στη συνέχεια επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται (αγγειογένεση). Παράλληλα, κατά την ενδοεμβρυϊκή αγγειοποίηση τα EPC συνενώνονται άμεσα δημιουργώντας ένα πρωτογενές αγγειακό δίκτυο που συγχωνεύεται για να σχηματίσει τελικά τη ραχιαία αορτή και την πρώτη κύρια φλέβα. Τα MC προσελκύονται και ενσωματώνονται ώστε να σταθεροποιήσουν τα νέα αγγεία (αγγειακή μυογένεση) και να δημιουργήσουν ένα ώριμο αγγειακό δίκτυο, που θα αποτελείται από αρτηρίες, αρτηριόλια φλέβες, φλεβίδια και τριχοειδή.

1.2.2 Η αγγειογένεση (angiogenesis)

Η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά οργανωμένη διαδικασία με την οποία νέα αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα με δύο κύριους μηχανισμούς: την εκβλάστηση (sprouting) και τον εγκολεασμό (intussusception). Πρώτη ανακαλύφτηκε η αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης, η οποία ρυθμίζεται από ειδικούς αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες και έχει μελετηθεί εκτεταμένα [80].

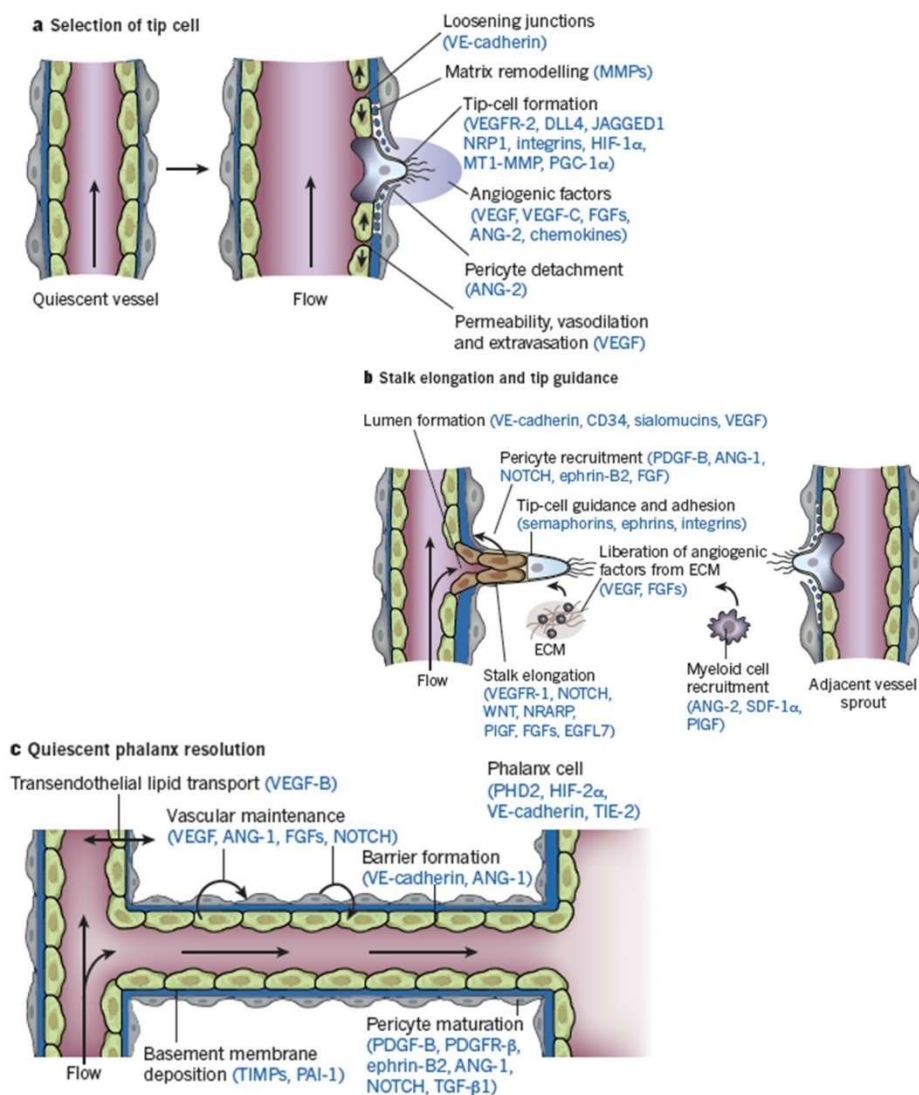


Εικόνα 1.7 Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών της αγγειοποίησης και της αγγειογένεσης. **A.** Η αγγειοποίηση περιλαμβάνει τον *de novo* σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από *in situ* διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων. **B.** Η αγγειογένεση περιλαμβάνει τη δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα μέσω δημιουργίας εκβλαστήσεων είτε μέσω εγκολεασμού.

Σε έναν υγιή ενήλικα, τα EC που βρίσκονται σε ηρεμία έχουν μακρά ημιζωή και προστατεύονται από την αυτοκρινή δράση των σημάτων συντήρησης, όπως ο VEGF, το NOTCH, η αγγειοπιετίνη-1 (ANG-1) και οι FGFs (Fibroblast Growth Factors). Επειδή τα αγγεία τροφοδοτούν τον οργανισμό με οξυγόνο, τα EC είναι εξοπλισμένα με αισθητήρες οξυγόνου και παράγοντες που επάγονται από την υποξία, όπως ο HIF-2α (hypoxia-inducible factor-2α και επιτρέπουν στα αγγεία να προσαρμόσουν εκ νέου το σχήμα τους για να βελτιστοποιήσουν τη ροή του αίματος. Τα EC που βρίσκονται σε ηρεμία σχηματίζουν μια μονοστιβάδα κυττάρων φάλαγγας (phalanx) και διασυνδέονται με συνδετικά μόρια, όπως η VE-cadherin. Αυτά τα EC περιβάλλονται

από PC, τα οποία καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των EC και απελευθερώνουν σήματα κυτταρικής επιβίωσης, όπως ο VEGF και η ANG-1. Τα EC και τα PC σε ηρεμία παράγουν μια κοινή βασική μεμβράνη. Όταν ένα αγγείο που βρίσκεται σε ηρεμία ανιχνεύσει ένα αγγειογενετικό σήμα, όπως ο VEGF, η ANG-2, οι FGFs ή χημειοκίνες, που απελευθερώνεται από ένα υποξικό, φλεγμονώδες ή καρκινικό κύτταρο, τότε πρώτα τα PC αποσυνδέονται από το τοίχωμα του αγγείου (σε απόκριση στην ANG-2) και απελευθερώνονται από τη βασική μεμβράνη με πρωτεολυτική αποδόμηση, που είναι διαμεσολαβούμενη από MMPs [81] (Εικόνα 1.8A). Τα EC χαλαρώνουν τις συνδέσεις μεταξύ τους και το αγγείο διαστέλλεται. Ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα του αυλού των EC, προκαλώντας εξαγγείωση των πρωτεϊνών του πλάσματος θεσπίζοντας ένα προσωρινό ικρίωμα ECM (provisional ECM) [81]. Σε απόκριση στη σηματοδότηση ιντεγκρινών, τα EC μεταναστεύουν σε αυτήν την επιφάνεια της ECM. Οι πρωτεάσες ελευθερώνουν αγγειογενετικά μόρια που είναι 'αποθηκευμένα' στην ECM, όπως ο VEGF και ο FGF και αναδιαμορφώνουν την ECM σε αγγειοσυμβατό (angio-competent) περιβάλλον [81]. Για να δημιουργηθεί ένας διαπερατός αυλός και να αποτραπεί η μαζική κίνηση των EC προς το αγγειογενετικό σήμα, ένα EC, γνωστό ως κύτταρο κορυφής (tip cell), επιλέγεται για να οδηγήσει το άκρο της εκβλάστησης, παρουσία παραγόντων, όπως οι υποδοχείς του VEGF, οι νευροπίλινες (NRPs) και οι προσδέτες του NOTCH DLL4 και JAGGED1 (Εικόνα. 1.8A). Τα γειτονικά κύτταρα των κυττάρων κορυφής αναλαμβάνουν δευτερεύουσες θέσεις ως κύτταρα στελέχους (stalk cells). Αυτά διαιρούνται για να επιμηκύνουν την εκβλάστηση (διεγείρονται από τα μόρια NOTCH, NRARP (NOTCH-regulated ankyrin repeat protein) WNTs, PlGF (placental growth factor) και FGFs) εγκαθιστώντας τον νέο αυλό [81] (μεσολάβείται από τη δράση των VE-cadherin, CD34, VEGF και hedgehog) (Εικόνα 1.8B). Τα κύτταρα κορυφής είναι εξοπλισμένα με φιλοπόδια για την ανίχνευση σημάτων καθοδήγησης στο περιβάλλον τους, όπως οι εφρίνες και οι σημαφορίνες (semaphorins), ενώ τα κύτταρα στελέχους απελευθερώνουν μόρια, όπως ο EGFL7 στην ECM για να μεταβιβάσουν χωρικές πληροφορίες σχετικά με τη θέση των γειτόνων τους, έτσι ώστε η εκβλάστηση να επιμηκύνεται [81]. Ένα πρόγραμμα που επάγεται από την υποξία, καθοδηγείται από τον HIF-1α και καθιστά τα EC ικανά να ανταποκρίνονται στα αγγειογενετικά σήματα. Τα μυελοειδή κύτταρα βοηθούν στη σύντηξη με μία άλλη αγγειακή εκβλάστηση, επιτρέποντας στη συνέχεια την έναρξη της ροής του αίματος

[81]. Όμως, για να γίνει ένα αγγείο λειτουργικό, πρέπει να είναι ώριμο και σταθερό. Τα EC συνεχίζουν να βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας (Εικόνα 1.8C) και σήματα όπως ο PDGF-B, η ANG-1, ο TGF- β και το NOTCH, προκαλούν την κάλυψη από PC. Οι αναστολείς πρωτεασών, γνωστοί ως TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) και ο PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), προκαλούν την εναπόθεση μιας βασικής μεμβράνης και οι συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων αποκαθίστανται για να διασφαλιστεί η βέλτιστη ροή.



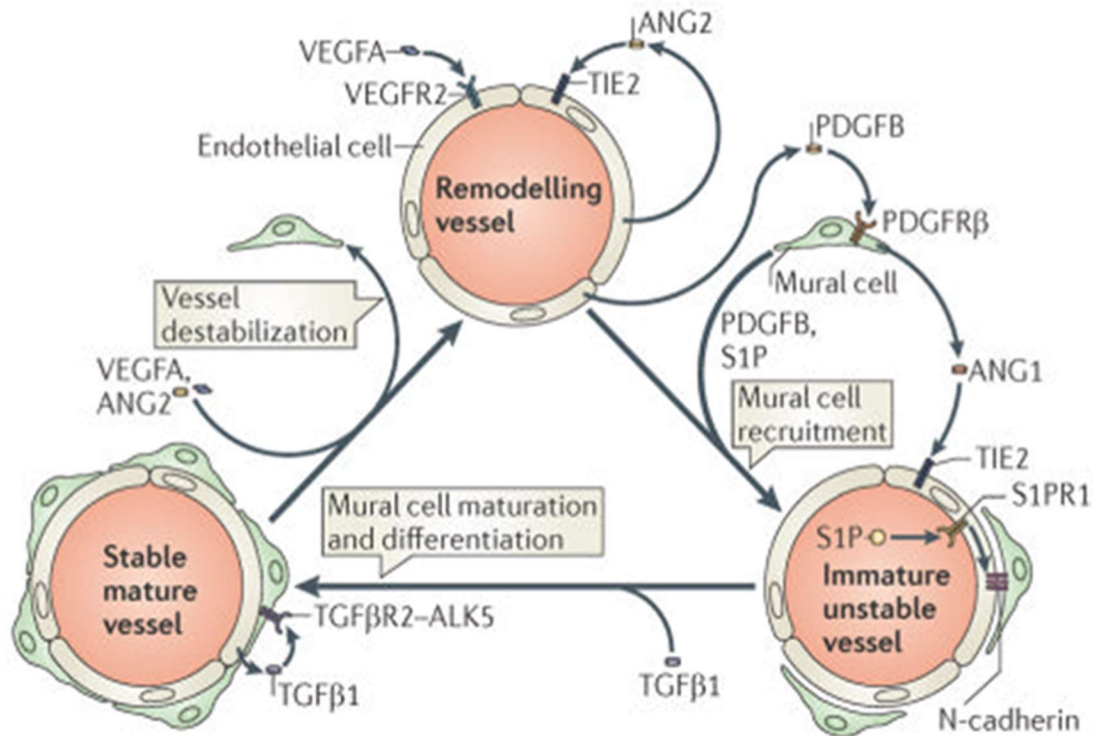
Εικόνα 1.8 Τα διαδοχικά βήματα της αγγειογένεσης με εκβλάστηση και τα βασικά μόρια που εμπλέκονται. Α. Μετά από διέγερση με αγγειογενετικούς παράγοντες, το ήρεμο αγγείο διαστέλεται και επιλέγεται ένα ενδοθηλιακό κύτταρο κορυφής (DLL4 και JAGGED1) για να εξασφαλιστεί ο σχηματισμός της εκβλάστησης. Η δημιουργία των κυττάρων κορυφής απαιτεί αποδόμηση της βασικής μεμβράνης, αποκόλληση των PC και χαλάρωση των συνδέσεων των EC. Η αυξημένη διαπερατότητα επιτρέπει την εξαγγείωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (όπως το ινωδογόνο και η φιβρονεκτίνη) εναποθέτοντας μία προσωρινή ECM, ενώ οι

πρωτεάσες αναδιαμορφώνουν την προϋπάρχουσα διάμεση ουσία, καθιστώντας δυνατή την κυτταρική μετανάστευση. Για απλότητα, απεικονίζεται η βασική μεμβράνη μόνο μεταξύ των EC και των PC, αλλά στην πραγματικότητα, τόσο τα PC όσο και τα EC είναι ενσωματωμένα σε αυτή. Β. Τα κύτταρα κορυφής σε απόκριση σε σήματα καθοδήγησης (όπως σηματοφορίνες και εφρίνες) προσκολλώνται στην ECM (μεσολάβηση από ιντεγκρίνες) για να μεταναστεύσουν. Τα κύτταρα στελέχους πίσω από τα κύτταρα κορυφής πολλαπλασιάζονται, επιμηκύνονται και σχηματίζουν τον αυλό. Οι εκβλαστήσεις συντήκονται για να δημιουργήσουν ένα νέο, διαπερατό αγγείο. Τα πολλαπλασιαστικά κύτταρα στελέχους προσελκύουν τα PC και εναποθέτουν πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης για να σταθεροποιηθούν. Τα προσληφθέντα μυελοειδή κύτταρα μπορούν να παράγουν προ-αγγειογενετικούς παράγοντες ή να απελευθερώσουν πρωτεολυτικά παράγοντες αγγειογενετικής ανάπτυξης από την ECM. C. Μετά τη σύντηξη γειτονικών εκβλαστήσεων, ο σχηματισμός του αυλού επιτρέπει την έναρξη της ροής στο νέο αγγείο, το οποίο συνεχίζει να βρίσκεται σε ηρεμία, αποκαταστήνοντας τις κυτταρικές συνδέσεις, την εναπόθεση της βασικής μεμβράνης, την ωρίμανση των PC και την παραγωγή σημάτων αγγειακής συντήρησης [81].

Η αγγειογένεση με εγκολεασμό καλείται, επίσης, αγγειογένεση διαχωρισμού (splitting angiogenesis), διότι το αγγειακό τοίχωμα επεκτείνεται μέσα στον αυλό προκαλώντας το διαχωρισμό ενός αγγείου σε δύο. Πλεονεκτήματα αυτού του μηχανισμού είναι ότι ο όγκος και η επιφάνεια του αγγείου αυξάνονται σημαντικά σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, χωρίς να απαιτείται εκτεταμένος πολλαπλασιασμός ή μετανάστευση των EC και αποικοδόμηση της ECM [82]. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό συμβαίνει καθόλη τη διάρκεια της ζωής, αλλά διαδραματίζει προεξέχοντα ρόλο κατά την αγγειακή ανάπτυξη στα έμβρυα, όταν η ανάπτυξη είναι γρήγορη και οι πηγές κυττάρων είναι περιορισμένες [83],[84]. Πρώτη φορά ανακαλύφθηκε σε μετα-εμβρυϊκούς πνεύμονες [80].

1.2.3 Η αγγειακή μυογένεση

Η στρατολόγηση των MC (PC και vSMC) στα νεοσχηματισθέντα αιμοφόρα αγγεία διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη σταθεροποίηση και την ωρίμανση των νέων αγγειακών δικτύων. Αρχικά, ο PDGFB απελευθερώνεται από τα EC που υποβάλλονται σε αγγειακή αναδιαμόρφωση (Εικόνα 1.9). Ο PDGFB που δεσμεύεται στην εξωκυτάρια ουσία, δρα ως χημειοελκυστικό για την προσέλκυση των PC που εκφράζουν τον υποδοχέα PDGFRβ [86],[11],[87],[88]. Τα PC που έχουν προσελκυθεί ενσωματώνονται στο τοίχωμα των ανώριμων αγγείων και δημιουργούν άμεσες επαφές EC-MC και μπορεί να ενισχυθούν με το βιοδραστικό λιπίδιο S1P (sphingosine1



Εικόνα 1.9 Η αγγειακή μυογένεση. Οι αλληλεπιδράσεις των EC-MC κατά την προσέλκυση των MC σε ένα αγγείο και τα μόρια που συμμετέχουν [85].

phosphate) μέσω σηματοδότησης με τον υποδοχέα S1PR1 (επίσης γνωστός ως EDG1), μία πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεοτιδίων γουανίνης (G πρωτεΐνη), ο οποίος είναι συζευγμένος με τα EC [86],[11],[89],[90]. Η έκκριση του S1P από τα αιμοπετάλια, τα αιμοποιητικά κύτταρα και τα EC μπορεί να προάγει τη διαμεσολαβούμενη από τον S1PR1 διακίνηση της N-cadherin (neural cadherin) σε περιοχές επαφής των EC-PC και τη δημιουργία συνδέσεων (adherens junctions) [91]. Επιπλέον, η απελευθέρωση της ANG1 από τα MC ενεργοποιεί τον υποδοχέα TIE2 στα EC [92], ο οποίος πιστεύεται ότι προάγει την επιβίωση των EC, διατηρεί την ηρεμία αυτών και διαμεσολαβεί την προσκόλληση των MC [86],[11],[93]. Η επακόλουθη διαφοροποίηση των PC σε vSMC, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητή, μπορεί να προκληθεί, εν μέρει, από την απελευθέρωση του παράγοντα TGFβ1 από τα EC. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ALK5, γνωστό και ως TGFβR1 (ο οποίος σχηματίζει ένα ετερομερές σύμπλοκο με τον TGFβR2) από τον TGFβ1 στα MC μπορεί στη συνέχεια να προάγει τη διαφοροποίηση των vSMC [94] για να δημιουργήσει ήρεμα, ώριμα αγγεία, στα οποία έχουν ενσωματωθεί τα vSMC [86],[11]. Είναι σημαντικό, ότι αυτή η όλη διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί σε απόκριση σε προ-αγγειογενετικά σήματα, όπως ο VEGFA ή η

ANG2, που προωθούν την αποκόλληση των MC και την αποσταθεροποίηση των αγγείων επιτρέποντας την αγγειακή αναδιαμόρφωση [93],[95].

1.2.4 Ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο κυριότερος αυξητικός παράγοντας που εμπλέκεται τόσο στην αγγειοποίηση, όσο και στην αγγειογένεση είναι ο VEGF. Στα θηλαστικά η οικογένεια πρωτεϊνών του VEGF αποτελείται από πέντε μέλη: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και τον PlGF, τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα. Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν δομική ομολογία με τον VEGF υπάρχουν και στους ιούς, όπως ο VEGF-E, καθώς και στο δηλητήριο αρκετών φιδιών, μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστές ως VEGF-F [96],[97],[98]. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, στα οποία υπολείπονταν η έκφραση του VEGF, ανέδειξαν τον καθοριστικό ρόλο του στον σχηματισμό των αγγείων. Συγκεκριμένα, ομόζυγα VEGF knock out ποντίκια πεθαίνουν την E8-9 εξαιτίας της αδυναμίας σχηματισμού νησίδων αίματος στο λεκιθικό σάκο, της παρουσίας ανωμαλιών κατά την ανάπτυξη των EC και τον σχηματισμό αγγείων [99]. Είναι εντυπωσιακό ότι ακόμη και ένα αλληλόμορφο του VEGF να εκλείψει τα ποντίκια πεθαίνουν, αφού εμφανίζουν ανωμαλίες κατά την πρώιμη αγγειακή ανάπτυξη [99]. Ο VEGF-A είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας. Ακόμη και ένα αλληλόμορφο του να εκλείψει τα έμβρυα πεθαίνουν [100]. Είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη των EC κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και την οργανογένεση του αγγειακού δικτύου. Ακόμη, είναι απαραίτητος για την επιβίωση των EC, από τα οποία μπορεί να εκκρίνεται και να δρα αυτοκρινώς [101].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VEGF (VEGF-A) αποτελείται από οκτώ εξόνια. Εναλλακτικό μάτισμα του mRNA αφαιρεί επιλεκτικά τις περιοχές ιντρονίων και ενώνει συγκεκριμένους συνδυασμούς εξονίων, για τη δημιουργία διακριτών ισομορφών του VEGF. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 5 διαφορετικές ισομορφές, 121, 145, 165, 189 και 206 αμινοξικών καταλοίπων [102],[103], που διαφέρουν ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες [104]. Οι VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ και VEGF-A₁₈₉ αποτελούν τις κύριες ισομορφές που εκκρίνονται από τους περισσότερους τύπους κυττάρων [105], ενώ ο VEGF-A₁₆₅ αποτελεί την επικρατούσα μορφή του VEGF-A στα διάφορα είδη κυττάρων [106]. Ο VEGF-A₁₄₅ αποτελεί το κύριο μετάγραφο σε

περιπτώσεις καρκινικών σειρών προερχόμενες από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα [103], ενώ η isoμορφή VEGF-A₂₀₆ είναι σπάνια. Ο ανθρώπινος VEGF-A₁₆₅ εκφράζεται τυπικά ως ένα ομοδιμερές των 46kDa αποτελώντας την πιο άφθονη μορφή και την πιο βιολογικά ενεργή, όπως φάνηκε μέσα από *in vivo* μελέτες [107], [108]. Οι VEGF-B και PlGF εκφράζονται και οι δύο ως isoμορφές που παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα [109],[110]. Ο VEGF-B εμφανίζει παρόμοια ενδοθηλιακή μιτογόνο δράση με τον VEGF-A. Οι VEGF-C και VEGF-D λόγω της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα VEGFR3 [111], χαρακτηρίστηκαν αρχικά για τον ρόλο τους στη λεμφαγγειογένεση.

Η γονιδιακή έκφραση του VEGF επάγεται από μία ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, όπως ο PDGF, ο EGF, ο TNF-α, ο TGF-β1 και η ιντερλευκίνη 1β. Είναι εντυπωσιακό ότι τα επίπεδα οξυγόνου ρυθμίζουν αυστηρά τα επίπεδα του VEGF, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει από την ευαισθησία του στην υποξία, η οποία επάγει την έκφρασή του (Ενότητα 1.2.2). Έτσι, ο HIF αποτελεί ισχυρό ρυθμιστή της έκφρασης του VEGF-A σε αυξανόμενους ιστούς, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές διαδικασίες [112]. Η έκθεση σε υποξία επάγει γρήγορα και μη αναστρέψιμα την έκφραση του VEGF. Η επαγωγή αυτή παρέχει έναν συνεργιστικό μηχανισμό με τον οποίο οι ιστοί μπορούν να αυξήσουν την οξυγόνωσή τους, μέσω της δημιουργίας νέων αγγείων. Από την άλλη τα φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου ρυθμίζουν αρνητικά την παραγωγή VEGF και οδηγούν σε καταστολή συγκεκριμένων νεοσυντιθέμενων αγγείων.

1.2.4.1 Οι υποδοχείς του VEGF

Οι κυτταρικές αποκρίσεις στον VEGF βασίζονται κυρίως στη δέσμευσή του σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με εγγενή δραστηριότητα κινάσης σε κατάλοιπα τυροσίνης (Receptor tyrosine Kinase, RTK), τους VEGFRs. Υπάρχουν τρεις υπότυποι VEGFR που κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια: ο VEGFR1 (ή Flt-1 σε ποντίκια), ο VEGFR2 (ή Flk-1/KDR) και ο VEGFR3 (ή Flt-4). Οι VEGFRs εκφράζονται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων, όπως τα EC και τα μακροφάγα [113], τα αιματοποιητικά κύτταρα, καθώς και τα SMC και τα καρκινικά κύτταρα [114],[115]. Για την

ενεργοποίηση ενός υποδοχέα, ο VEGF συνδέεται με ένα συγγενή VEGFR για να προκαλέσει τον διμερισμό του (ομο ή ετερο-διμερισμό).

Κάποια μέλη της οικογένειας του VEGF αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς υποδοχείς, ενώ άλλα εμφανίζουν πολύ εξειδικευμένες ιδιότητες πρόσδεσης ως προς τον υποδοχέα. Ο PlGF και ο VEGF-B εμφανίζουν εξειδίκευση για τον VEGFR1 [116],[117], ο VEGF-E προσδένεται στον VEGFR-2 [118] και οι VEGF-C, VEGFR-D προσδένονται στον VEGFR3.

Η πρόσδεση των VEGF-C και VEGFR-D διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη λεμφαγγειογένεση [119], ενώ ο VEGFR3 σε μικρότερο βαθμό σχετίζεται και με την αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης, καθώς η έκφρασή του έχει βρεθεί στα κύτταρα κορυφής. Η σηματοδότηση του VEGF-A διαμεσολαβείται μέσω των VEGFR1 και VEGFR2 και οδηγεί στη φυσιολογική και παθοφυσιολογική αγγειογένεση. Παρόλο που ο VEGF-A δεσμεύει τον VEGFR1 με υψηλότερη συγγένεια από τον VEGFR2, εμφανίζει 10 φορές ασθενέστερη δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης από τον VEGFR2, γεγονός που υποδηλώνει τον ρόλο του ως υποδοχέα "δόλωμα" στην πρώιμη εμβρυογένεση [120],[121], ρυθμίζοντας αρνητικά τη δραστηριότητα του VEGFR2 [122],[123]. Παρά τη διαφορετική δράση των δύο υποδοχέων, η λειτουργική σημασία και των δύο κατά την πρώιμη αγγειακή ανάπτυξη έχει επιβεβαιωθεί. VEGFR1-null mutant ποντίκια πεθαίνουν την E8.5-9.0, λόγω υπερανάπτυξης των EC και αγγειακής αποδιοργάνωσης [124]. Ομοίως, τα ποντίκια που δεν εκφράζουν τον VEGFR2 στερούνται της διαφοροποίησης των EC, του σχηματισμού νησίδων αίματος και της αγγειογένεσης και πεθαίνουν μεταξύ E8.5-9.5 [125].

1.2.4.II Ο ρόλος των συν-υποδοχέων στη σηματοδότηση του VEGF

Η σηματοδότηση από τον VEGF βασίζεται στην ενεργοποίηση των τριών υποδοχέων του: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3. Επίσης, οι λειτουργίες του VEGF-A διαμεσολαβούνται από δύο τύπους συν-υποδοχέων, τις νευροπιλίνες -1 και -2 (NRP-1, -2) [126] και τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαρίνης (Heparin Sulphate Proteoglycans, HSPGs) [126].

Η NRP-1 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία υπολείπεται καταλυτικής δραστηριότητας. Αρχικά, αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας της οικογένειας των σεμαφορινών, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη νευρωνική

ανάπτυξη [127],[128]. Η NRP-2 είναι μια στενά συγγενική πρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίστηκε αργότερα ως επιπρόσθετος υποδοχέας για τις σεμαφορίνες [129]. Η NRP-1 προσδέεται στην καρβοξυτελική περιοχή του VEGF-A165, ενώ αναγνωρίζει επίσης και τον VEGF-B, αλλά δεν αναγνωρίζει τον VEGF121. Και οι δύο NRPs έχουν μεγάλη ομολογία αλληλουχίας και ανεξάρτητα από τον ρόλο τους στη νευρωνική καθοδήγηση, παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη σηματοδότηση από τον VEGF, αφού οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση και επιβίωση των EC [130], όσο και στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος, συντονίζοντας τη λειτουργία των δομικά μη συσχετιζόμενων προσδεμάτων της οικογένειας του VEGF [129],[131].

Οι HSPGs βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στην κυτταρική επιφάνεια και την ECM και μπορούν να δράσουν ως μια πρόσθετη, χαμηλής συγγένειας θέση δέσμευσης για τον VEGF, ικανή να τροποποιήσει την πρόσδεση του VEGF στους υποδοχείς του [132]. Χαμηλές συγκεντρώσεις της ηπαρίνης (H) και της θεικής ηπαρίνης (HS), έχουν αναφερθεί να αυξάνουν τη δέσμευση του VEGF σε ανθρώπινα EC απομονωμένα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC), ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις τη μειώνουν [133]. Επιπρόσθετα, η «παρουσίαση» του VEGF στον trans VEGFR2 από τις HSPGs που εκφράζονται στα γειτονικά κύτταρα, όπως τα PC, αυξάνει περαιτέρω την ένταση και τη διάρκεια του σήματος από τον VEGF, πιο πιθανό μπλοκάροντας την εσωτερίκευση του υποδοχέα [134].

1.2.4.III Η ενεργοποίηση και σηματοδότηση από τον VEGFR2

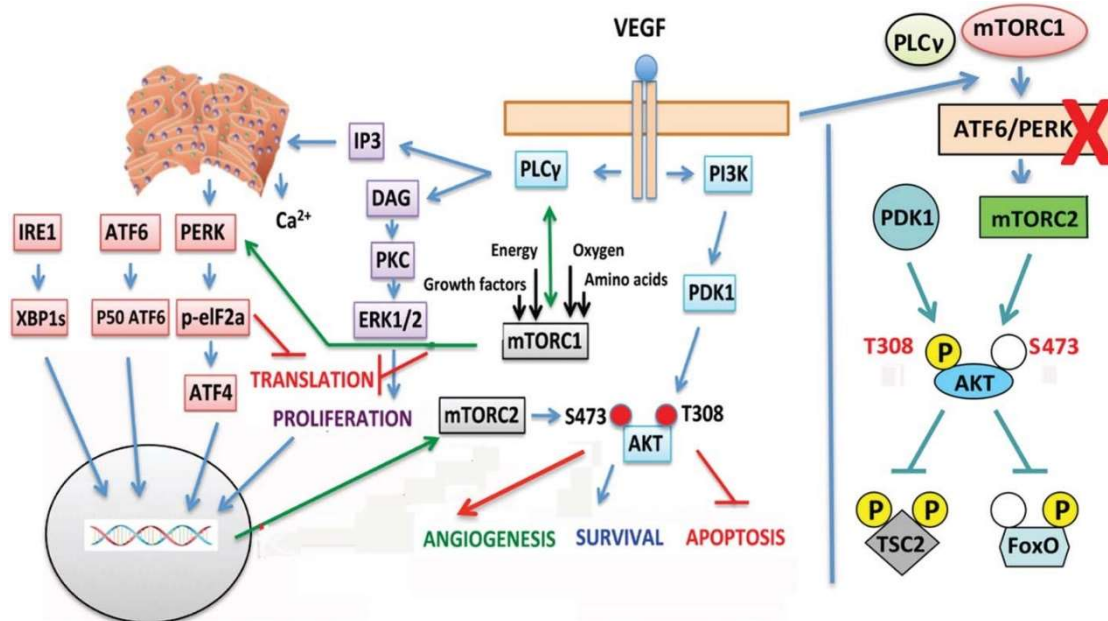
Από τους τρεις υποδοχείς, ο VEGFR2 είναι κρίσιμος για τη ρύθμιση της αγγειογένεσης, καθώς μεταδίδει τα σήματα για την προώθηση του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της μετανάστευσης των EC. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης μέσω εκβλάστησης, τα κύτταρα κορυφής πρέπει να αποκτήσουν έναν “επεμβατικό” και κινητικό φαινότυπο, μεταναστεύοντας έξω από το αγγείο στον εξωκυτταρικό χώρο, στον οποίο πρέπει να επιβιώσουν, ενώ τα EC στελέχους εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό. Μετά τη σύνδεση του VEGF-A στον υποδεχέα, ακολουθεί η φωσφορυλίωση του VEGFR2 στο Tyr1175 και η προσέλκυση και ενεργοποίηση της PLCγ, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην υδρόλυση του PIP2

σε IP₃ και DAG. Η IP₃ ενεργοποιεί τους διαύλους του ενδοπλασματικού δικτύου απελευθερώνοντας Ca²⁺, ενώ η DAG μέσω ενεργοποίησης του PKC, φωσφορυλιώνει την MAPK (mitogen- activated protein kinase)/ ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase-1/2) οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό των EC, παρακάμπτοντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras [135]. Η φωσφορυλίωση του Tyr1214 του VEGFR2 ενεργοποιεί τη SAPK2/ρ38 MAPK [136], οδηγώντας σε επαγόμενη από τον VEGF, αναδιοργάνωση της ακτίνης και μετανάστευση των EC μέσω φωσφορυλίωσης της HSP27 (heat-shock protein-27) [137] και της LIMK1 (LIM- kinase 1) [138].

Επιπλέον, το ενεργό σύμπλοκο των VEGF-A/VEGFR2 προσελκύει την GAB (πρωτεΐνη δέσμησης της GRB2) 1, η οποία με τη σειρά της προσελκύει την υπομονάδα p85 της PI3K, οδηγώντας στη δημιουργία του PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). Το PIP3 ενεργοποιεί τη GTPase Rac με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεμβρανικών πτυχώσεων και την κινητικότητα των κυττάρων, αλλά επίσης οδηγεί σε φωσφορυλίωση των Akt/PKB μέσω PDK1 και mTORC2. Η Akt μεταφέρει αντι-αποπτωτικά σήματα, έτσι, η ενεργοποίηση των PI3K/Akt θεωρείται το κύριο μονοπάτι του VEGF-A στα EC απαραίτητο για την επιβίωσή τους (Εικόνα 1.10, αριστερό πλαίσιο) [139].

Σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας έχει δειχθεί ότι ο VEGF-A ενεργοποιεί τους αισθητήρες της απόκρισης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER-residing sensors of Unfolded Protein Response) IRE1, ATF6 και PERK. Αυτή η ενεργοποίηση συμβαίνει απουσία στρες ενδοπλασματικού δικτύου και είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης της ενεργοποιημένης PLCγ με το mTORC1 παρουσία VEGF [140]. Πειράματα απόλειψης έδειξαν ότι ο VEGF-A ασκεί διπλό έλεγχο στην επιβίωση των EC. Το πρώτο ήταν το γνωστό μονοπάτι επιβίωσης VEGF-VEGFR2/PI3K/PDK1/p-Thr308AKT, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ωστόσο, η επαγόμενη από τον VEGF-A επιβίωση των EC και η αγγειογένεση ήταν μέγιστη όταν, εκτός από το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης της Akt (βλ. παραπάνω) δύο σηματοδοτικά μονοπάτια, τα VEGF-VEGFR2/PLCγ-mTORC1/ATF6/ATF6f και VEGF-VEGFR2/PLCγ-mTORC1/PERK/p-eIF2a είναι, επίσης, ενεργοποιημένα και οδηγούν σε φωσφορυλίωση της AKT στη Ser473 (pSer473AKT).

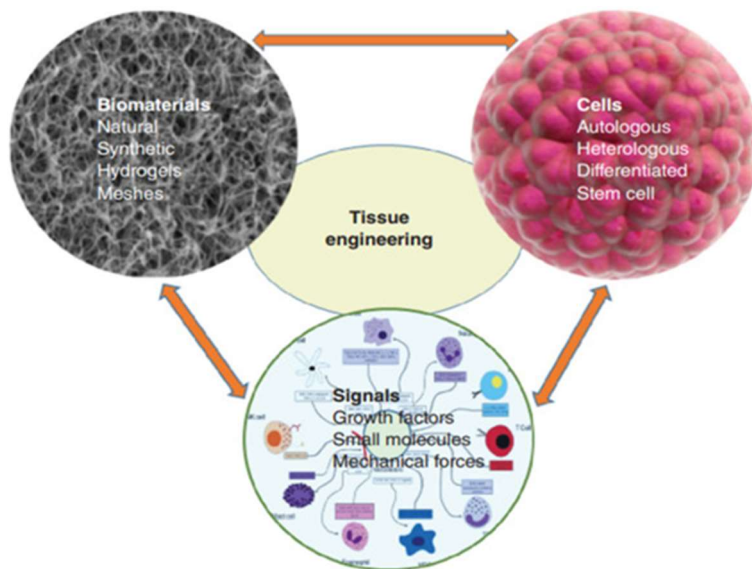
Πράγματι, η AKT και η επίδραση αυτής στην επιβίωση και στην αγγειογένεση παρουσία VEGF, είναι πλήρως ενεργοποιημένη μόνο όταν φωσφορυλιώνεται και στα δύο κατάλοιπα, Thr308 και Ser473 [8] (Εικόνα 1.10). Ορισμένοι καθοδικοί στόχοι μονοφωσφορυλιωμένων AKT δεν επηρεάζονται, ωστόσο, υπάρχουν άλλοι, όπως το FOXO1, που επηρεάζονται, επιτρέποντας την έκφραση γονιδίων που πρέπει να κατασταλούν πλήρως για την έναρξη της αγγειογένεσης [140].



Εικόνα 1.10 Κυκλώματα σηματοδότησης του VEGF στην αγγειογένεση. Αριστερό πλαίσιο: Κατά την σύνδεση του προσδέτη στον VEGFR2 ενεργοποιείται η PLCγ και η PI3K που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των EC μέσω ενεργοποίησης των οδών ERK1/2 MAPK και AKT. Επιπλέον, ο VEGF ενεργοποιεί τις IRE1, ATF6 και PERK μέσω της αλληλεπίδρασης της PLCγ με το mTORC1 σύμφωνα με την απουσία ER stress. Στην πραγματικότητα, η ενεργοποίηση των ATF6 και PERK ρυθμίζει θετικά τη μεσολαβούμενη από το mTORC2 φωσφορυλίωση της AKT στη Ser473, που διατηρεί την AKT σε πλήρως ενεργό στάδιο (δεξί πλαίσιο). Δεξί πλαίσιο: η AKT είναι πλήρως ενεργοποιημένη όταν φωσφορυλιώνεται στη Thr308 και στη Ser473 από το PDK1 και mTORC2, αντίστοιχα. Η σηματοδότηση μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου διατηρεί το mTORC2 ενεγό και την AKT διπλά φωσφορυλιωμένη.

1.3 Δημιουργία αγγειωμένων ιστικών κατασκευών *in vitro*

Η ζήτηση για μεταμόσχευση οργάνων συνεχώς αυξάνεται, με τη λίστα των ασθενών που βρίσκονται σε αναμονή να μαγαλώνει. Μόνο το 2015 στις Ηνωμένες Πολιτείες ο αριθμός αυτός έφτασε τις 80.000 [141]. Παράλληλα, η διαφορά μεταξύ του αριθμού των ασθενών που περιμένουν για μεταμόσχευση και του αριθμού των διαθέσιμων οργάνων έχει αυξηθεί δραματικά, με την έλλειψη οργάνων να προκαλεί πολλούς θανάτους και μία αυξημένη κοινωνική επιβάρυνση [142],[143]. Την ίδια στιγμή η AI υπόσχεται την επιδιόρθωση, την αντικατάσταση ή την αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων που δυσλειτουργούν ή έχουν καταστραφεί λόγω ασθενειών, γενετικών νοσημάτων ή και τραυμάτων [1]. Η τεχνολογία της MI συνδυάζοντας μια πηγή κυττάρων για τη σύνθεση της νέας μήτρας του ιστού, ένα ικρίωμα-μία δομή που μεταξύ άλλων θα παρέχει στήριξη για τον σχηματισμό της 3D δομής και βιομόρια-αυξητικούς παράγοντες που θα αποτελέσουν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον, παρέχοντας ερεθίσματα που θα καθοδηγήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων [3] (Εικόνα 1.11), σημειώνει μία συνεχιζόμενη πρόοδο για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος.

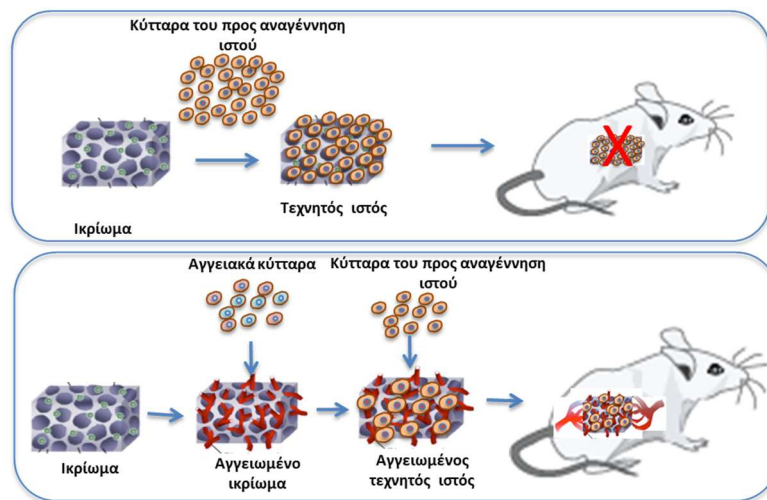


Εικόνα 1.11 Τα δομικά στοιχεία της μηχανικής ιστών. Ο συνδυασμός των κυττάρων που καλλιεργούνται σε ένα ικρίωμα με τα κατάλληλα χημικά σήματα συντονίζονται για να δημιουργήσουν την επιθυμητή ιστική κατασκευή.

Η πιο μεγάλη πρόκληση για την κλινική μετάφραση των 3D ιστικών κατασκευών που υπόσχεται η MI είναι η απαίτησή τους για αγγείωση. Ως μέρος της απόκρισης του οργανισμού-ξενιστή που θα δεχθεί το εμφύτευμα, το αγγειακό του δίκτυο θα αναπτυχθεί εισβάλλοντας και αγγειώνοντας το εμφύτευμα. Ωστόσο, η ανάπτυξη του δικτύου από τον ξενιστή προχωρά αργά, με ρυθμό μικρότερο από αρκετά δέκατα του mm την ημέρα [144], δηλαδή, είναι μια διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες ή εβδομάδες, γεγονός που σημαίνει ότι τα κύτταρα του εμφυτεύματος θα στερούνται τα θρεπτικά συστατικά το διάστημα αυτό [8]. Επίσης, η τροφοδοσία θρεπτικών ουσιών και η απομάκρυνση των αποβλήτων μέσω διάχυσης περιορίζεται σε απόσταση 100-200μm, μη μπορώντας να εξυπηρετήσει τις ανάγκες μεγαλύτερων κατασκευών [6],[7]. Ως αποτέλεσμα αυτών των γεγονότων μπορεί τα κύτταρα του μοσχεύματος να οδηγηθούν στην απόπτωση (Εικόνα 1.12). Για να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την αγγείωση μιας ιστικής κατασκευής, διερευνάται η δυνατότητα δημιουργίας αγγειωμένων ιστικών κατασκευών πριν από την εμφύτευσή τους. Αυτό το δίκτυο θα έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί με το αγγειακό σύστημα του ξενιστή, με αποτέλεσμα μια ταχύτερη, λειτουργική αγγείωση του εμφυτεύματος [145]. Ο τομέας της MI που έχει αναδυθεί για να καλύψει αυτή την ανάγκη και υφίσταται ταχεία ανάπτυξη είναι αυτός της μηχανικής των αγγείων των ιστών (Vascular Tissue Engineering), συμβάλλοντας στη δημιουργία τόσο μεγάλων όσο και μικρών αγγείων και τριχοειδών. Περιλαμβάνει τη χρήση των αγγειακών κυττάρων, τα οποία με διάφορες στρατηγικές μπορούν να αυτοοργανωθούν σε 3D αγγειακές δομές ή/και τη χρήση ικριωμάτων που θα υποστηρίξουν την επιβίωση και την 3D οργάνωση των κυττάρων [144]. Τέλος, η δράση των κατάλληλων αυξητικών παραγόντων μπορεί να ενισχύσει τις λειτουργίες των κυττάρων, δημιουργώντας το κατάλληλο περιβάλλον.

1.3.1 Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα ως πηγή αγγειακών κυττάρων

Η λεπτομερής κατανόηση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων κάθε κυτταρικού τύπου είναι κρίσιμη για την επιλογή της κατάλληλης πηγής αυτών και των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας προκειμένου να σχεδιαστεί ένας συγκεκριμένος ιστός [146]. Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.1, τα αγγεία αποτελούνται από δύο τύπους κυττάρων, τα EC και τα MC (SMC και PC). Ιστορικά, τα αυτόλογα αγγειακά κύτταρα που συλλέγονται από πρωτογενείς ιστούς (όπως τμήματα φλέβας) αποτέλεσαν τη συνήθη πηγή για τη δημιουργία αγγειωμένων ιστικών κατασκευών. Ως προς τα EC, τα HUVEC παραμένουν μία από τις πιο δημοφιλείς σειρές των EC που χρησιμοποιούνται λόγω του χαμηλού κόστους, της απλής απομόνωσης και του υψηλού αγγειογενετικού δυναμικού τους [147], παράγοντες που έχουν συμβάλει στην ευρεία χρήση τους. Ωστόσο, η κλινική εφαρμογή των κυττάρων αυτών έχει αξεπέραστους περιορισμούς [148]. Οι εξελίξεις στον τομέα των βλαστικών κυττάρων έχει φέρει στο επίκεντρο τη χρήση των ESC και των iPSC ως μία ανεξάντλητη πηγή κυττάρων [4].



Εικόνα 1.12 Η δημιουργία αγγειωμένων ιστικών κατασκευών θα συμβάλει στην ταχεία σύνδεση τους με το αγγειακό δίκτυο του ξενιστή και κατ'επέκταση στην επιβίωσή τους.

1.3.1.1 Τα Βλαστικά κύτταρα (Stem Cells)

Τα SC ορίζονται από την ικανότητα αυτοανανέωσής και διαφοροποίησης σε έναν ή πολλοπλούς τύπους κυττάρων [149],[150], καθώς και από ένα απεριόριστο αναγεννητικό δυναμικό [151],[152],[153]. Ανάλογα με την ικανότητα

διαφοροποίησής τους, αναφέρονται ως ολοδύναμα (totipotent), πολυδύναμα (pluripotent), ολιγοδύναμα (multipotent) ή μονοδύναμα (unipotent) [154],[155].

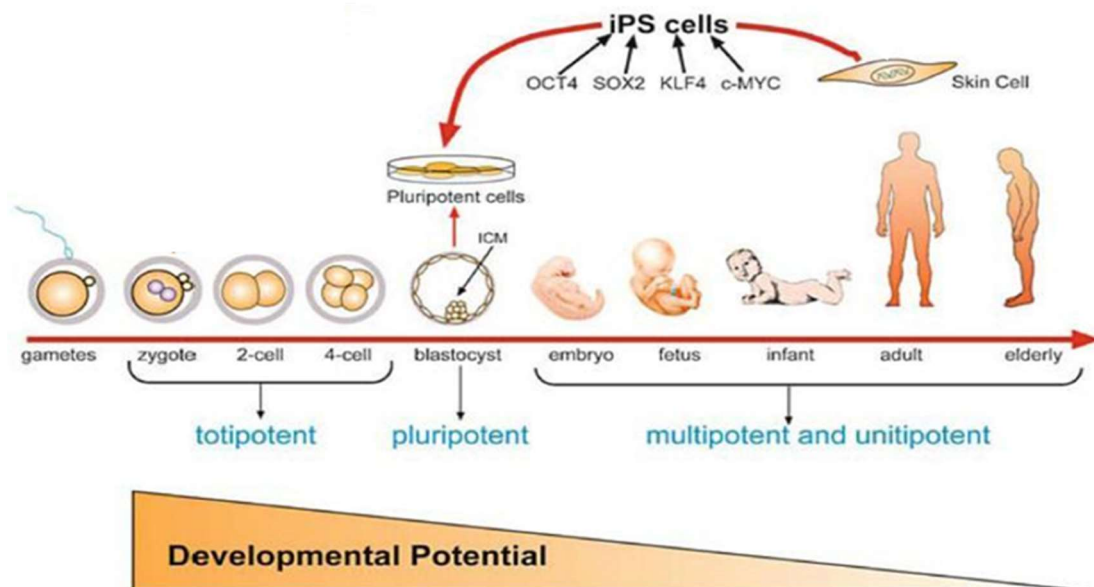
Το “απόλυτο” εμβρυϊκό βλαστικό κύτταρο είναι το γονιμοποιημένο ωάριο. Διαμορφώνεται από την σύντηξη των απλοειδών γαμετών, δηλαδή, του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου και έχει όλα τα χαρακτηριστικά της ολοδυναμίας. Τα ολοδύναμα SC είναι αυτά που βρίσκονται στο έμβρυο από το στάδιο του ζυγωτού έως το στάδιο των 8-16 πρώτων κυττάρων. Η φυσική εξέλιξη τους είναι να δημιουργήσουν εξωεμβρυϊκές δομές (όπως ο πλακούντας, οι εμβρυϊκές μεμβράνες και ο ιστός που έρχεται σε άμεση επαφή με το ενδομήτριο) για την υποστήριξη του εμβρύου, καθώς επίσης και τη βλαστοκύστη. Από τη βλαστοκύστη θα προκύψουν οι 3 εμβρυϊκές στιβάδες (εξώδερμα, ενδόδερμα και μεσόδερμα). Με την εξέλιξη της εμβρυογένεσης, τα ολοδύναμα SC, μετατρέπονται σε πολυδύναμα και χάνουν τη δυνατότητα σχηματισμού νέου ολοκληρωμένου οργανισμού, αλλά διατηρούν αυτή του σχηματισμού των 3 εμβρυϊκών στιβάδων. Τα ESC είναι τα πολυδύναμα κύτταρα και απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (5-7 ημέρες μετά την γονιμοποίηση). Αρχικά απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικών στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και αργότερα από διάφορα είδη, όπως οι αρουραίοι, τα κουνέλια, τα πρόβατα, οι χοίροι, τα άλογα και το 1998 από τον άνθρωπο [156]. Καθώς προχωράει η ανάπτυξη του οργανισμού, το πολυδύναμο δυναμικό των κυττάρων μειώνεται και προκύπτουν SC με ολιγοδύναμες ή μονοδύναμες δυνατότητες [157]. Τα ολιγοδύναμα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένους, στενά συνδεδεμένους, κυτταρικούς τύπους. Ανάλογα, δηλαδή, την πηγή προέλευσής τους μπορούν να δημιουργήσουν αρκετούς τύπους κυττάρων του κάθε ιστού. Παράδειγμα αποτελούν τα αιμοποιητικά κύτταρα και τα MSC. Τα MSC έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για πάνω από τρεις δεκαετίες ως προς το θεραπευτικό τους δυναμικό πάνω σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Και ενώ προκλινικές μελέτες έδειχναν την ικανότητα τους να προάγουν την επούλωση των ιστών, τη μείωση της φλεγμονής και τη βελτίωση των αποτελεσμάτων σε ένα ευρύ φάσμα μοντέλων ασθενειών των ζώων [158], τα κλινικά αποτελέσματα παρουσίασαν μεταβλητά και αντιφατικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην μεγάλη ετερογένεια των κυττάρων αυτών όπως έχουν περιγραφεί έως σήμερα [159] (Ενότητα 1.1.2). Απομονώνονται από διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων

του μυελού των οστών (BM-MSC) [160], του λιπώδους ιστού (ASC) [152], του οδοντικού πολφού [21], των σκελετικών μυών [161], του δέρματος [162], του περιφερικού αίματος, του ήπατος [163], του νευρικού ιστού [164], της καρδιάς [165] και του εντέρου [166]. Τέλος, τα μονοκύτταρα είναι κύτταρα που αυτοανανεώνονται, πολλαπλασιάζονται και περιορίζονται στη διαφοροποίηση προς κύτταρα ενός μόνο συγκεκριμένου ιστού. Εντοπίζονται στους ενήλικους οργανισμούς, σε σημεία όπου ο ιστός υφίσταται φθορές και αναλαμβάνουν την αντικατάσταση με προσθήκη νέων ίδιων κυττάρων. Παράδειγμα αποτελούν τα Spermatogonial stem cells.

Και ενώ η ανακάλυψη των ESC στις αρχές του 21^{ου} αιώνα προκάλεσε μεγάλο ενδιαφέρον σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων αυτών της AI, της ανοσοθεραπείας και της δημιουργίας νέων φαρμάκων, η χρήση τους αντιμετώπισε κάποιες προκλήσεις. Αυτές ήταν η περιορισμένη πρόσβαση στους ιστούς προέλευσης και κυρίως οι ηθικοί φραγμοί σε σχέση με αυτούς, καθώς και η δυσκολία λήψης κυττάρων κατάλληλων ποιοτικά για κλινική εφαρμογή και το υψηλό ρίσκο, λόγω της ικανότητας τερατογένεσης που παρουσιάζουν [153],[167],[168],[169],[170].

Πολλούς από τους περιορισμούς αυτούς ήρθαν να ξεπεράσουν τα iPSC [171],[172],[173],[174]. Ο βραβευμένος με Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής (2012) Yamanaka και η ομάδα του ήταν οι πρώτοι που κατόρθωσαν τον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών ποντικού το 2006 [171], ενώ ένα χρόνο αργότερα ανέφεραν την δημιουργία iPSC προερχόμενα από ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος. Τα iPSC δημιουργούνται από ενήλικα κύτταρα με υπερέκφραση των εμβρυϊκών γονιδίων ή των μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται "παράγοντες Yamanaka", συμπεριλαμβανομένου του Oct4/3 (octamer-binding transcription factor 4/3), Sox2 (SRY-sex determining region Y -Box Transcription Factor 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) και c-Myc (c-Myelocytomatosis) [171],[172],[173],[174]. Σε κυτταρικό επίπεδο τα iPSC είναι πανομοιότυπα με τα ESC, λόγω των εγγενών ικανοτήτων τους να αυτοανανεώνονται και να πολλαπλασιάζονται. Επιπλέον, τα iPSC έχουν το πλεονέκτημα της εύκολης πρόσβασης στα κύτταρα που τα δημιουργούν, της εύκολης επέκτασης και της ικανότητας διαφοροποίησης προς όλους τους τύπους κυττάρων [175],[176]. Δεδομένου ότι προέρχονται από ινοβλάστες και άλλα σωματικά κύτταρα και όχι από έμβρυα, ξεπερνούν τους σημαντικούς ηθικούς περιορισμούς αναφορικά με τη χρήση τους. Οπλισμένα με τέτοιες ιδιότητες, τα iPSC στο πρόσφατο παρελθόν

συνέβαλαν σημαντικά στην πρόοδο της βιολογίας των SC και της AI, ειδικά προς την κατεύθυνση της εξατομικευμένης ιατρικής. Η τεχνολογία των iPSC έχει ενσωματώσει καινοτόμες τεχνολογίες, όπως τη γονιδιωματική τροποποίηση (gene editing) και τον σχηματισμό 3D οργανοειδών, τα οποία έχουν εντείνει σημαντικά τις προσπάθειες για τη μοντελοποίηση των νόσων, την ανακάλυψη φαρμάκων και την κυτταρική θεραπεία [177],[178]. Παρόλα αυτά, ακόμη και με την ενσωμάτωση τέτοιων μεθοδολογιών και τεχνολογιών, η διαφοροποίηση αποκλειστικά σε συγκεκριμένα κάθε φορά κύτταρα-στόχους παραμένει πρόκληση [179],[180],[181].

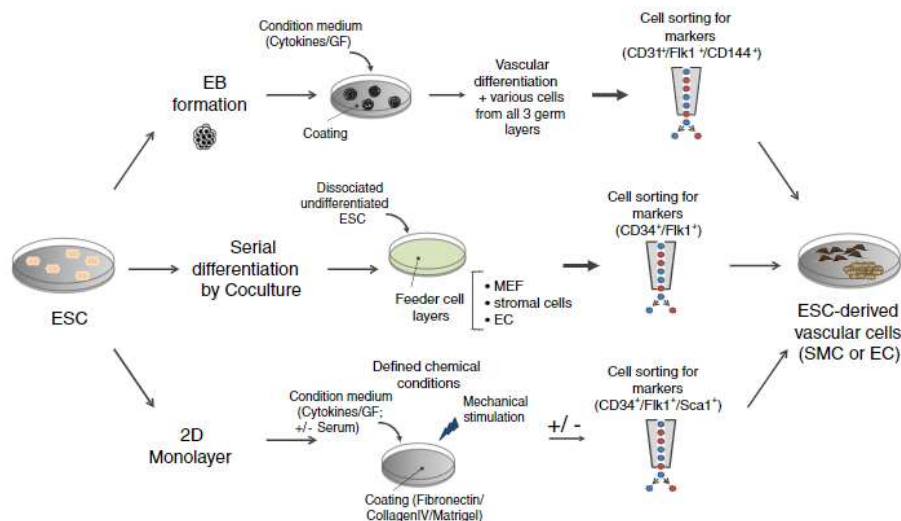


Εικόνα 1.13 Ανάπτυξη και επαναπρογραμματισμός κυττάρων. Η οντογένεση ξεκινάει από το ζυγωτό. Το ζυγωτό και κάθε βλαστομερίδιο του πρώιμου εμβρύου είναι ολοδύναμο με δυναμικό ανάπτυξης ολόκληρου οργανισμού. Με την αύξηση των κυττάρων, όμως, το δυναμικό διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων φθίνει συντελώντας στην ύπαρξη πολυδύναμων, ολιγοδύναμων, μονοδύναμων και τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων. Πλέον υπάρχει η δυνατότητα επαναπρογραμματισμού τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων (iPSC) ώστε να επιστρέψουν στην κατάσταση της πολυδυναμίας.

1.3.1.II Στρατηγικές διαφοροποίησης ανθρώπινων PSC προς αγγειακά κύτταρα

Η δυνατότητα χρήσης των πολυδύναμων SC (pluripotent stem cells, PSC) στην AI εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων διαφοροποίησης να παράγουν τα εξειδικευμένα κύτταρα του εκάστοτε προς αναγέννηση ιστού. Διαφορετικές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να επάγουν τη διαφοροποίηση των PSC *in vitro*. Οι στρατηγικές αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις

κατηγορίες με βάση τη μέθοδο της καλλιέργειας: διαφοροποίηση μέσω σχηματισμού εμβρυϊκών σωμάτων (embryoid bodies-EB), μέσω συγκαλλιέργειας επάνω σε τροφοδοτικές στιβάδες ινοβλαστών, είτε μέσω καλλιέργειας σε μία μονοστιβάδα και επαγωγή με συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των PSC. Η διαφοροποίηση προς αγγειακά κύτταρα επάγεται μέσω τριών μεθοδολογιών: σχηματισμό EB, καλλιέργεια επάνω σε τροφοδοτικές στιβάδες, είτε μέσω καλλιέργειας σε μία μονοστιβάδα και επαγωγή με συγκεκριμένους παράγοντες. Όλα τα πρωτόκολλα γενικά απαιτούν απομόνωση του επιθυμητού κυτταρικού τύπου με κυτταρομετρία ροής (FACS) ή μαγνητικά σωματίδια (MACS) σύμφωνα με την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών, όπως οι CD34, Flk1, Sca1 ή CD144, ώστε να ληφθεί ο επιθυμητός πληθυσμός και να είναι ομοιογενής [182].

Τα EB είναι συσσωματώματα hPSC που σχηματίζονται έπειτα από την καλλιέργεια αυτών σε εναιώρημα. Η αυθόρμητη διαφοροποίηση των EB μπορεί να δημιουργήσει και τις 3 βλαστικές στιβάδες και με δεδομένη την 3D αρχιτεκτονική προσεγγίζουν την ανθρώπινη εμβρυογένεση [183]. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει σημαντικούς περιορισμούς. Έχουν ένα χαμηλό ποσοστό διαφοροποίησης, 1-3% για τα EC [184],[185],[186] και 10% για τα SMC [187], υπάρχει ετερογενής έκθεση των κυττάρων σε συστατικά του θρεπτικού μέσου, όπως και σε αυξητικούς παράγοντες, απαιτούνται σύνθετες συνθήκες καλλιέργειας και μηχανικός διαχωρισμός για την απόκτηση μονήρη κυττάρων.

Η παρουσία των τροφοδοτικών κυττάρων κατά τη συγκαλλιέργεια με τα PSC θέτει από μόνη της πολλούς περιορισμούς τόσο στη μετέπειτα χρήση των διαφοροποιημένων κυττάρων, όσο και στην κατανόηση της πορείας διαφοροποίησης. Τα κύτταρα της τροφοδοτικής στιβάδας μπορεί να προέρχονται ακόμη και από διαφορετικό είδος, όπως MSC από το μυελό των οστών ποντικού [188],[189],[190],[191],[192],[182],[193]. Επίσης, οδηγούν στη δημιουργία αγγειακών προγονικών κυττάρων που εκφράζουν τον δείκτη CD34 σε ποσοστό μικρότερο του 10% [188].

Τα πρωτόκολλα που βασίζονται στην καλλιέργεια και διαφοροποίηση κυττάρων σε μονοστιβάδα είναι τώρα η πιο κοινή μέθοδος παραγωγής αγγειακών κυττάρων από hPSC. Αν και διατηρούν τα μειονεκτήματα που εμφανίζει μία τυπική 2D καλλιέργεια, πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η ευκολία στη χρήση, ο έλεγχος της έκθεσης των κυττάρων σε αυξητικούς παράγοντες και η εύκολη εφαρμογή διαφόρων τεχνικών για τη φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων. Επίσης, απομάκρυνση/μη χρήση ζωικών προϊόντων και αντικατάσταση του ορού, ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση από ξеноβιοτικούς παράγοντες, φέρνει τα παραγόμενα κύτταρα ένα βήμα πιο κοντά στην κλινική εφαρμογή. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα κατά τα οποία επάγεται η διαφοροποίηση των PSC αρχικά προς μεσόδερμα και στη συνέχεια προς EC σε χημικά καθορισμένες συνθήκες, γεγονός που μιμείται την αγγειακή διαφοροποίηση που συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ζωή [194],[195] και μάλιστα επιτυγχάνεται ένα ικανοποιητικό ποσοστό διαφοροποίησης (25-40%). Η απόκτηση του επιθυμητού πληθυσμού απαιτεί την απομόνωση των προγονικών κυττάρων που εκφράζουν δείκτες όπως οι CD34, FLK1, CD144 και SCA-1 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των PSC [196],[197],[198]. Τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης των PSC προς τα MC αφορούν κατά βάση πρωτόκολλα διαφοροποίησης προς μεσεγχυματικά κύτταρα μέσω μεσοδέρματος ή νευρικής ακρολοφίας. Επίσης, πρόσφατα αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο όπου τα hPSC διαφοροποιούνται προς PC, SMC και MSC μέσω ενός κοινού πρόδρομου μεσεγχυμοαγγειοβλάστη [199].

1.3.2 Δημιουργία 3D ιστικών κατασκευών με τη χρήση ικριωμάτων

Ως ικρίωμα στη MI ορίζεται μία προσωρινή “κατασκευή” που χρησιμεύει ως μία 3D μήτρα, υποστηρίζοντας την αρχική προσκόλληση και/ή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων διευκολύνοντας το σχηματισμό ενός λειτουργικού 3D ιστού *de novo*. Τα ικρίωματα, εκτός των κατά περίπτωση ειδικών απαιτήσεων, πρέπει να πληρούν ορισμένες γενικές προδιαγραφές. Πρέπει να είναι βιομιμητικά, βιοαποικοδομήσιμα [200], να διαθέτουν την κατάλληλη μηχανική αντοχή και τους βέλτιστους μικροπόρους καθιστώντας σε κάθε περίπτωση ικανή την αγγειοποίηση και επιτρέποντας την ικανοποίηση των μεταβολικών αναγκών. Θα πρέπει, επίσης, να είναι βιοσυμβατά [201], μη ανοσογόνα [202] και ευέλικτα σε σχέση με τις μεθόδους κατασκευής [203] και τον έλεγχο της 3D μικροαρχιτεκτονικής. Τα κύτταρα δεν απαιτούν ένα ικρίωμα μόνο για δομική υποστήριξη, αλλά θέλουν το κατάλληλο 3D βιοφυσιοχημικό περιβάλλον που επιπλέον τους παρέχει τον σωστό συνδυασμό αυξητικών παραγόντων, σημάτων διαφοροποίησης, επιτρέπει τη ρύθμιση του pH και την παρουσία μηχανικών δυνάμεων.

Τα ικρίωματα μπορεί να προέρχονται από φυσικά ή συνθετικά υλικά. Επίσης, μπορεί να είναι μία κλασική 3D πορώδης κατασκευή, μια υδρογέλη, ή ένας συνδυασμός των δύο. Ο συνδυασμός και των δύο ευνοείται ιδιαίτερα στην περίπτωση της 3D βιοεκτύπωσης (bioprinting), επειδή δίνει τη δυνατότητα να τοποθετηθούν διαφορετικοί τύποι κυττάρων και υλικών σε καθορισμένες θέσεις της σχηματιζόμενης δομής [204]. Η χρήση της φυσιολογικά παραγόμενης ECM ενός ιστού, απουσία των κυττάρων, ως ικρίωμα, είναι μια νέα ταχύτατα ανπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη τάση [205].

Οι υδρογέλες ορίζονται ως πολυμερή υψηλής περιεκτικότητας σε υγρασία (>30% w/w νερό), που διατηρούν δομική ακεραιότητα με φυσικές και χημικές εγκάρσιες συνδέσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων [206]. Χρησιμοποιούνται στη μηχανική των αγγείων των ιστών για μια σειρά διαφορετικών ρόλων. Μπορούν να χρησιμεύσουν ως προσωρινή ECM κατά τη διάρκεια σχηματισμού ενός νέου αγγειακού δικτύου, να παρέχουν μηχανική υποστήριξη στα κύτταρα, επιτρέποντας την προσκόλληση και τη μετανάστευση τους, μπορούν να λειτουργήσουν ως ενέσιμος κυτταρικός φορέας ή μετά από την κατάλληλη τροποποίηση να

απελευθερώνουν ελεγχόμενα αυξητικούς παράγοντες επάγωντας το σχηματισμό αγγειακού δικτύου.

Από τη μεγάλη ποικιλία υδρογελών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μηχανική των ιστών ένα υποσύνολο αυτών έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικό στην κατασκευή του αγγειακού δικτύου. Η αποτελεσματικότητά τους μπορεί να αποδοθεί στους ρόλους των συστατικών τους κατά τη δημιουργία αγγείων φυσιολογικά στον οργανισμό, είτε στην ικανότητά τους να τροποποιούνται χημικά ή να παρέχουν ορισμένες περιοχές που προάγουν τα αιμοφόρα αγγεία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το ινοδωγόνο, που είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές με σημαντικούς ρόλους κατά τη δημιουργία νέων αγγείων σε περιπτώσεις όπως η επούλωση πληγών [207],[208] και έχει λάβει έγκριση από τον οργανισμό FDA για χειρουργική χρήση [209]. Το matrigel που είναι συνδυασμός πρωτεϊνών της ECM και αυξητικών παραγόντων, ορίζεται ως "διαλυτοποιημένη βασική μεμβράνη", προέρχεται από το σάρκωμα ποντικού, με τα κύρια συστατικά του να είναι η λαμινίνη, το κολλαγόνο ΙV και η ενακτίνη [210], χωρίς ωστόσο η σύστασή του να είναι πλήρως καθορισμένη [211] και το υαλουρονικό οξύ, που είναι μια φυσική γλυκοζαμινογλυκάνη και ένα σημαντικό συστατικό της ECM στον συνδετικό ιστό [212].

1.3.3 Αυτοοργάνωση των κυττάρων σε 3D δομές

Παρόλο που η MI είναι άμεσα συνυφασμένη με τη δημιουργία και τη χρήση ικριωμάτων, υπάρχει μία προσέγγιση που βασίζεται στην αυτοσυναρμολόγηση [213] και την παραγωγή πρωτεϊνών της ECM από τα ίδια τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται. Είναι μια bottom-up στρατηγική που χρησιμοποιεί προκατασκευασμένα πολυκυτταρικά δομικά στοιχεία, όπως "κυτταρικά φύλλα" (cell sheets) και σφαιροειδή. Στηρίζεται στην εγγενή ικανότητα αυτών των δομικών στοιχείων να συνδέονται σχηματίζοντας μεγαλύτερες κατασκευές. Ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα αυτής της στρατηγικής είναι η ικανότητα να αντιμετωπίσει την αρχιτεκτονική των πολύπλοκων ιστών και οργάνων μέσω της ελεγχόμενης συναρμολόγησης ετερογενών δομικών στοιχείων που αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

Τα οργανοειδή είναι πολυκυτταρικές, αυτοσυναρμολογούμενες/ αυτοσχηματιζόμενες 3D κατασκευές ιστού *in vitro*, που μιμούνται ένα αντίστοιχο όργανο *in vivo*, ως προς τους τύπους των κυττάρων που το συνθέτουν, τη δομή και τη λειτουργία του. Έτσι, μπορούν να περιγραφούν ως εργαστηριακά μικροσκοπικά μοντέλα οργάνων και να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη διαφόρων πτυχών του συγκεκριμένου οργάνου *in vitro* [214]. Αρχικά, οι όροι σφαιροειδή και οργανοειδή χρησιμοποιήθηκαν ως συνώνυμοι. Πλέον διακρίνονται καθώς τα σφαιροειδή σε σύγκριση με τα οργανοειδή παρουσιάζουν πολύ μικρότερη ομοιότητα με τον αρχικό ιστό [215], αποτελώντας συσσωματώματα/συστάδες συνήθως ενός μόνο τύπου διαφοροποιημένων κυττάρων.

Τα πολυκύτταρα σφαιροειδή/οργανοειδή έχουν γίνει αναμφισβήτητα το πιο δημοφιλές δομικό στοιχείο στον τομέα της MI χωρίς ικρίωμα [216],[217]. Η δομή αυτή επιτρέπει τη φυσική επαφή και αλληλεπίδραση του κάθε κυττάρου τόσο με κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού τύπου, όσο και με την ECM και στις 3 διαστάσεις, επιτρέποντας τη μετάδοση πληροφοριών. Πληροφορίες που συμβάλλουν στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της μετανάστευσης, της σταθερότητας του φαινότυπου ή της διαφοροποίησης, της πόλωσης, της φυσιολογικής μεταβολικής λειτουργίας και της επιβίωσης [218],[219]. Ένα ακόμη πλεονέκτημα στη χρήση τους είναι ότι μπορεί να ελεγχθεί τόσο η σύνθεση όσο και το μέγεθός τους και να προσαρμοστεί στις ανάγκες της εκάστοτε εφαρμογής. Έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για τον καρκίνο ως βιομιμητικά *in vitro* μοντέλα για τη μελέτη θεμελιωδών μηχανισμών στη βιολογία των όγκων [220],[221]. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανακάλυψη φαρμάκων και για τον έλεγχο της τοξικότητας τους [222],[223]. Αναμένεται να γεφυρώσουν το χάσμα μεταξύ της 2D κυτταρικής καλλιέργειας και των ζωικών μοντέλων και ως ένα βαθμό να υποκαταστήσουν τη χρήση των δεύτερων, αίροντας τον περιορισμό της διαφοράς του είδους που σίγουρα επηρεάζει τα αποτελέσματα, καθώς και ηθικά ζητήματα που προκύπτουν από τη χρήση των πειραματόζωων. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές κατασκευής σφαιροειδών [224],[225] με τις βασικότερες να είναι οι καλλιέργειες κρεμάμενων σταγόνων [226],[227], οι συσκευές μικρορευστών (*microfluidics devices*) [228] και οι καλλιέργειες σε υποστρώματα χαμηλής προσκόλλησης [229].

Η σφαιροειδής συσσωμάτωση έχει αποδειχθεί ότι σταθεροποιεί τα EC, ενώ παράλληλα τους επιτρέπει να ανταποκρίνονται στη δράση των παραγόντων επιβίωσης [230]. Επιπλέον, όταν τα σφαιροειδή των EC ενσωματώθηκαν σε μια ποικιλία βιοϋλικών, χρησίμευσαν ως εστίες εκκίνησης εκβλαστήσεων τριχοειδών [231],[232]. Στο πλαίσιο αυτό, μικτά σφαιροειδή που αποτελούνται από EC και πληθυσμούς MC θα μπορούσαν να εγγυηθούν το φυσιολογικό μικροπεριβάλλον για τη λειτουργία τους και να προσφέρουν τη δυνατότητα πολλαπλών εφαρμογών στον τομέα της μηχανικής των αγγείων των ιστών, καθώς και στον ευρύτερο τομέα της MI.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Η Αναγεννητική Ιατρική (AI) επικεντρώνεται στην επισκευή, την αντικατάσταση ή την αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων για την αποκατάσταση μειωμένης λειτουργίας που προκαλείται από συγγενή ελαττώματα, ασθένειες και τραύματα. Κυρίως, η AI αναπτύσσει κυτταρικές θεραπείες χρησιμοποιώντας την αναγεννητική ικανότητα των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (hESC) και των επαναπρογραμματισμένων ισοδυνάμων τους (hiPSC). Αυτό το επιτυγχάνει με τη βοήθεια της μηχανικής ιστών, δημιουργώντας βέλτιστα μικροπεριβάλλοντα για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και τη δημιουργία εμφυτεύσιμων ιστικών κατασκευών με τη σωστή χωροταξική οργάνωση.

Μια σημαντική απαίτηση για βιωσιμότητα και λειτουργία της εμφυτεύσιμης ιστικής κατασκευής είναι η διαθεσιμότητα αιμοφόρων αγγείων για την υποστήριξη της *in vivo* ανάπτυξής του. Η αναγέννηση ιστού άνω των 100-200μm υπερβαίνει την ικανότητα παροχής θρεπτικών ουσιών και απομάκρυνσης απορριμμάτων με διάχυση και απαιτεί τη δημιουργία αγγειακού δικτύου [6],[7]. Δυστυχώς, όμως, απαιτούνται αρκετές εβδομάδες για την πλήρη ανάπτυξη αγγειακού δικτύου σε μια ιστική κατασκευή *in vivo* [8]. Για το λόγο αυτό, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη δημιουργία αγγειωμένων κατασκευών για να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την αγγείωση και την επιβίωση του εμφυτεύματος. Μάλιστα δε, πρόσφατες εφαρμογές χρησιμοποιούν αγγειακά κύτταρα που δημιουργούνται από τη διαφοροποίηση των hiPSC [182].

Κύριος στόχος αυτής της Διατριβής είναι η δημιουργία βασικών και μεταφραστικών γνώσεων στην Αγγειακή Μηχανική (Vessel Engineering). Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας τα hESC διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε χημικά καθορισμένες συνθήκες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

- Η διαφοροποίηση των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (hESC και hiPSC) σε λειτουργικά τοιχωματικά κύτταρα
- Η χρήση των ενδοθηλιακών και των τοιχωματικών κυττάρων για τη δημιουργία μιας τρισδιάστατης αγγειακής δομής, που θα βρίσκει εφαρμογή στον τομέα της MI.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια των hPSC (hESC, hiPSC)

Η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των hPSC απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων θρεπτικών μέσων σε συνδυασμό με προσεκτικούς χειρισμούς, ώστε να παραμείνει υψηλή η ποιότητα της καλλιέργειας μετά από κάθε ανακαλλιέργεια. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό ήταν το mTeSR™¹ (Stem Cell Technologies). Πρόκειται για ένα πλήρως χημικώς καθορισμένο θρεπτικό μέσο, απαλλαγμένο από ξеноβιοτικούς παράγοντες και ορό ζώων.

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν hESC της σειράς H1 (Wicell Research Institute, Madison, USA) και iPSC τα οποία είχαν δημιουργηθεί από επαναπρογραμματισμό τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων (ανθρωπίνου ινοβλάστες, ATCC #CRL 242) από μέλη της ομάδας μας [233]. Τόσο τα hESC όσο και τα iPSC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων (Corning, 3506) που ήταν επιστρωμένα με 1% matrigel (Corning, 354277) και πραγματοποιούνταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου mTeSR™¹ κάθε 24h.

Καθώς οι αποικίες των κυττάρων μεγάλωναν, παρατηρούνταν κάποιες ομάδες κυττάρων με διαφορετική μορφολογία. Εμφανίζονταν είτε ως μεμονωμένες αποικίες, είτε προσκολλημένες στα άκρα ομοιόμορφων αποικιών και αποτελούσαν κύτταρα που διαφοροποιούνταν προς άγνωστη κατεύθυνση. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα αυτά αφαιρέθηκαν, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια της καλλιέργειας. Το ποσοστό αυτών των κυττάρων ήταν πάντα μικρότερο του 10%, ενώ η παρουσία τους αποτελεί δείκτη υγιούς καλλιέργειας. Μόνο καλλιέργειες που ικανοποιούσαν αυτό το κριτήριο χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές δοκιμασίες.

Τα hPSC ανακαλλιεργούνταν όταν οι περισσότερες αποικίες ήταν μεγάλες, συμπαγείς, με πυκνά κέντρα και τα άκρα τους άρχιζαν να ενώνονται (περίπου σε 7 ημέρες). Γενικά, υπήρχε ένα διάστημα 24 έως 48h, όπου θεωρούνταν ως το βέλτιστο για να πραγματοποιηθεί η ανακαλλιέργεια. Αν πραγματοποιηθεί εκτός αυτού του πλαισίου, ενδέχεται τα κύτταρα να αρχίσουν να διαφοροποιούνται, να μεταβληθεί η μορφολογία των αποικιών ή και να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου, με αποτέλεσμα να αλλοιωθεί η ποιότητα της καλλιέργειας.

Για την ανακαλλιέργεια ενός φρεατίου, τα φρεάτια όπου μεταφέρθηκαν τα κύτταρα καλύφθηκαν με 1% matrigel, αραιωμένο σε θρεπτικό μέσο DMEM/F12 και επώαστηκαν για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε 1 πλύση αυτών με DMEM/F12. Παράλληλα, το mTeSR^{TM1} επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, στο φρεάτιο με τα κύτταρα, αφού πραγματοποιήθηκε μία πλύση με 1ml DMEM/F12, προστέθηκε 1ml διασπάσης (1mg/ml, ThermoFisher Scientific, 1710541) και επώαστηκε για περίπου 1min, μέχρι που τα άκρα των αποικιών άρχισαν να συρρικνώνονται χωρίς όμως οι αποικίες να αποκολλώνται από το τρυβλίο. Μετά το πέρας της επώασης, απομακρύνθηκε η διασπάση και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις του φρεατίου με 2ml DMEM/F12, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα του ενζύμου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml mTeSR^{TM1} και με τη χρήση ενός scraper (Corning, 3010) τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου και μεταφέρθηκαν σε έναν κωνικό σωλήνα των 15ml. Για να είναι βέβαιο ότι μεταφέρθηκαν όλα τα κύτταρα και ότι δεν έγινε κάποιου είδους επιλογή, η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε ακόμη μία φορά. Δηλαδή, προστέθηκε ακόμη 1ml mTeSR^{TM1} στο φρεάτιο και με τη χρήση scraper αποκολλήθηκαν πιθανώς εναπομείναντα κύτταρα και μεταφέρθηκαν στον κωνικό σωλήνα. Οι αποικίες στη συνέχεια κατακερματίστηκαν με ήπια ανάδευση, ώστε να αποκτήσουν το καταλληλο μέγεθος και ισομοιράστηκαν στα φρεάτια σε μία αναλογία 1:7. Τέλος, το τρυβλίο ανακινήθηκε πολύ ήπια και τοποθετήθηκε στον επωαστήρα των 37°C.

2.2 Διαφοροποίηση των hESC σε EC

Η διαφοροποίηση των hESC προς EC πραγματοποιήθηκε σε χημικά καθορισμένες συνθήκες, απουσία δηλαδή ορού, σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί από μέλη της ομάδας μας [234]. Τα hESC καλλιεργήθηκαν σε φρεάτια επικαλυμμένα με matrigel και θρεπτικό μέσο mTeSR^{TM1}, όπως μετά από κάθε ανακαλλιέργεια. Έπειτα από 2 ημέρες (ημέρα 0) έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου στο μέσο που επάγει την διαφοροποίηση προς EC. Αυτό αποτελούνταν από το θρεπτικό μέσο APEL, του οποίου η σύνθεσή είναι χημικά καθορισμένη και έχει περιγραφεί λεπτομερώς [235], εμπλουτισμένο με έναν αναστολέα της GSK (CHIR, 5μM, Selleckchem, 99021).

Έπειτα από 24h έγινε εκ νέου αλλαγή του θρεπτικού με APEL εμπλουτισμένο με 25ng/ml BMP4 (Gibco, PHC9534) για άλλες 48h. Ακολούθησε αλλαγή του θρεπτικού σε APEL εμπλουτισμένο με 80ng/ml VEGF (Immunotools, 11343663) για 48h. Έπειτα, τα hESC-EPC (Endothelial Progenitor Cell) που εκφράζαν τον επιφανειακό δείκτη CD34 (25-35%) απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας αντι-CD34 ανοσομαγνητικά σφαιρίδια (EasySep Selection Kit, Stem Cell Technologies, 18056) (Ενότητα 2.2.1). Τα CD34+ απομονωμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φρεάτια επιστρωμένα με 5μg/cm² φιβρονεκτίνη (Corning, 354008), σε APEL θρεπτικό μέσο, εμπλουτισμένο με 50ng/ml VEGF. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν όλη τη διαθέσιμη επιφάνεια ανακαλλιεργήθηκαν, αφού πρώτα αποκολλήθηκαν ενζυμικά χρησιμοποιώντας 0,05% τρυψίνη (Gibco, 25300-054) και επιστρώθηκαν σε τρυβλία καλυμμένα με φιβρονεκτίνη σε αναλογία 1:2.

2.2.1 Απομόνωση CD34+ κυττάρων με τη χρήση αντι-CD34 ανοσομαγνητικών σφαιριδίων

Η απομόνωση των CD34+ κυττάρων βασίζεται στη σύνδεση αυτών με ένα τετραμερές σύμπλεγμα αντισωμάτων που αναγνωρίζει τα κύτταρα αυτά και παράλληλα τη δεξτράνη, με την οποία είναι επικαλυμμένα τα μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου. Έτσι, μετά τη δημιουργία του συμπλόκου, τα νανοσωματίδια σιδήρου και κατ' επέκταση τα CD34+ κύτταρα, λόγω του μαγνητικού πεδίου συγκρατούνται στα τοιχώματα ενός φιαλιδίου που βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου (Εικόνα 2.1).

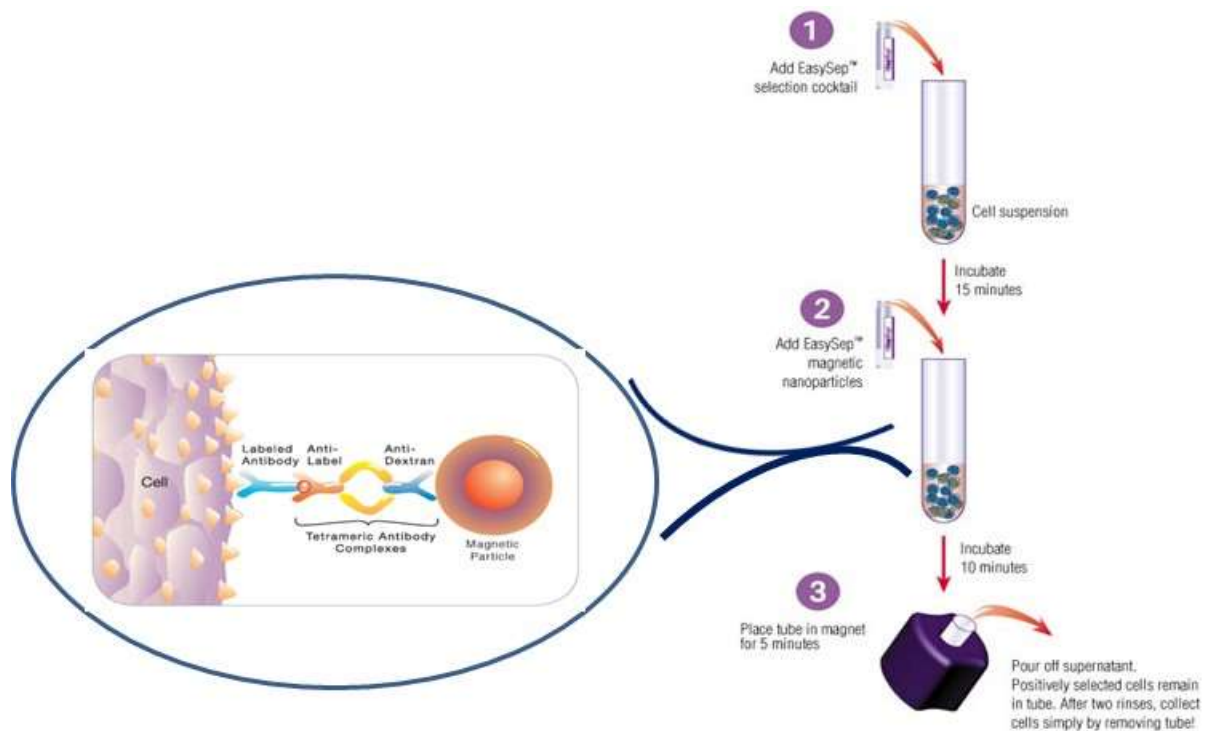
Συγκεκριμένα, την 5^η ημέρα της διαφοροποίησης, πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με PBS και επώαση με 0,05% τρυψίνη για περίπου 1min προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με διάλυμα PBS εμπλουτισμένο με 2% FBS (Gibco, 10270-106) και μεταφέρθηκαν σε έναν κωνικό σωλήνα των 15ml. Έπειτα, προκειμένου να διασφαλιστεί η απομόνωση μονήρη κυττάρων και όχι μεγάλων συσσωματωμάτων, το διάλυμα πέρασε δια μέσω φίλτρου με 70μm διάμετρο πόρων (Falcon BD, 340633). Τα κύτταρα μετρήθηκαν με τη χρήση της Neubauer και κάθε διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με κύτταρα που ο αριθμός τους δεν ξεπερνούσε τα 2×10^7 . Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για 5min στα 1400rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επανααιωρήθηκε σε 100μl διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με 2% FBS, για τη

δέσμευση των μη ειδικών θέσεων και προστέθηκαν 17μl διαλύματος που περιείχαν το τετραμερές σύμπλεγμα αντισωμάτων (Easy Sep selection cocktail), το οποίο αναγνωρίζει τον επίτοπο της πρωτεΐνης CD34 και το μόριο της δεξτράνης (Εικόνα 2.1). Μετά από επώαση 15min σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια των οποίων τα κύτταρα που εκφράζαν τον δείκτη CD34 συνδέθηκαν με το τετραμερές σύμπλεγμα αντισωμάτων, προστέθηκαν 7,5μl μαγνητικών νανοσωματιδίων σιδήρου, τα οποία ήταν επικαλυμμένα με δεξτράνη (Easy Sep magnetic nanoparticles). Πραγματοποιήθηκε επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη διάρκεια αυτής της επώασης δημιουργήθηκε ένα συμπλοκο που περιελάμβανε τα κύτταρα που εκφράζαν το CD34, το τετραμερές σύμπλεγμα αντισωμάτων και τα επικαλυμμένα με δεξτράνη μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου. Ακολούθως, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 5ml διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με 2% FBS, σε φιαλίδιο των 5ml (Becton Dickinson, 352058) και αυτό με τη σειρά του τοποθετήθηκε μέσα στο μαγνήτη για 5min. Κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης τα κύτταρα που εκφράζαν το CD34 συγκρατήθηκαν στα τοιχώματα του σωλήνα. Με το πέρας της επώασης και διατηρώντας τον σωλήνα μέσα στο μαγνήτη έγινε απόρριψη του περιεχομένου. Στη συνέχεια, ο σωλήνας απομακρύνθηκε από το μαγνήτη, πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση των κυττάρων (που λόγω του μαγνήτη συγκρατήθηκαν στα τοιχώματα) σε PBS εμπλουτισμένο με 2% FBS και επανάληψη της διαδικασίας για άλλες δύο φορές. Στο τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, μετρήθηκαν με τη χρήση της Neubauer, επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο APEL εμπλουτισμένο με 50ng/ml VEGF και επιστρώθηκαν σε φρεάτια εποκαλυμμένα με φμπρονεκτίνη.

2.2.2 In vivo σήμανση των κυττάρων με μη λειτουργικό αντίσωμα έναντι του VEGFR2

hESC επιστρώθηκαν σε τρυβλία ibidi και έπειτα από 2 ημέρες ξεκίνησε η διαφοροποίηση αυτών προς EC. Την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης αφαιρέθηκε το θρεπτικό και στην εσωτερική επιφάνεια του ibidi προστέθηκαν 10μl alexa488-KDR (novusbio, NB200-208AF488) αντισώματος μαζί με 180μl θρεπτικού μέσου APEL και επώαστηκαν για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν, πραγματοποιήθηκε μία πλύση με DMEMF-12 και προστέθηκε το θρεπτικό μέσο APEL εμπλουτισμένο με 50ng/ml VEGF, συνεχίζοντας κανονικά την πορεία της

διαφοροποίησης. 2 ημέρες μετά, τα κύτταρα που προσδέθηκε το αντίσωμα συνέχιζαν να φέρουν τον φθορισμό που τους προσέδιδε.



Εικόνα 2.1 Απομόνωση των CD34 θετικών κυττάρων με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.

2.3 Απομόνωση και καλλιέργεια EC από φλέβα ομφάλιου λώρου (HUVEC)

Οι ομφάλιοι λώροι (τουλάχιστον 3 σε κάθε απομόνωση) καθαρίστηκαν από το αίμα και η φλέβα τους πλύθηκε με PBS, με τη βοήθεια μιας σύριγγας. Το ένα άκρο κάθε λώρου κλείστηκε τοποθετώντας έναν αποστειρωμένο αιμοστάτη, ενώ από το άλλο άκρο χορηγήθηκε 0,1% κολλαγενάση διαλυμένη σε PBS και έπειτα κλείστηκε και αυτό, προσαρμόζοντας έναν ακόμη αιμοστάτη. Οι λώροι τοποθετήθηκαν σε PBS και επώαστηκαν στους 37°C για 12min. Έπειτα, το διάλυμα της κολλαγενάσης που περιείχαν οι λώροι, όπως και το έκπλυμα της φλέβας που έγινε με ένα διάλυμα αποτελούμενο από M199 εμπλουτισμένο με 5% FBS, συλλέχθηκαν σε κωνικό φιαλίδιο των 50ml. Φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 1.500rpm και το κυτταρικό

ίζημα επαναιωρήθηκε σε M199 (Gibco, 31150-022) εμπλουτισμένο με 20% FBS, 47μg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 4,7U/ml ηπαρίνη (Sigma, H-3149), 1% πενικιλίνη, 1% στρεπτομυκίνη και μεταφέρθηκε σε τρυβλία που προηγουμένως είχαν καλυφθεί με 25mg/ml κολλαγόνο ουράς αρουραίου τύπου I (Corning, 354236), επωαστεί για 30min στους 37°C και πλυθεί 2 φορές με PBS. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν όταν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου ήταν καλυμμένο. Τότε πραγματοποιούνταν μία πλύση με PBS, επώαση με πολύ μικρό όγκο 0,05% τρυψίνης για περίπου 1min στους 37°C, επαναιώρηση σε πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφορά σε τρυβλία επικαλυμένα με κολλαγόνο σε αναλογία 1:3.

2.4 Διαφοροποίηση των hPSC προς cSMC και sSMC

Προκειμένου να δημιουργηθεί ο συστατικός φαινότυπος των SMC (cSMC), τα hPSC καλλιεργήθηκαν σε φρεάτια επικαλυμένα με matrigel και θρεπτικό μέσο mTeSR^{TM1}. Δυο ημέρες μετά από τη συνήθη ανακαλλιέργειά τους πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε αυτό που επάγει τη συγκεκριμένη διαφοροποίηση (CDM, Contractile Differentiation Medium). Πρόκειται για ένα βασικό θρεπτικό μέσο, ADSC (Lonza, PT-3273), εμπλουτισμένο με 2,5% FBS και glutamax (1x, Gibco, 35050). Πραγματοποιούνταν καθημερινή αλλαγή του θρεπτικού αυτού για 8 ημέρες. Την 9^η ημέρα τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν. Συγκεκριμένα, αποκολλήθηκαν ενζυμικά χρησιμοποιώντας 0,05% τρυψίνη και μεταφέρθηκαν σε φρεάτια τρυβλίου 6 φρεατίων, τα οποία είχαν καλυφθεί με 0,1% ζελατίνη (Millipore, ES-006-B), επωαστεί για 30min στους 37°C και πλυθεί με PBS, σε αναλογία 1:1. Γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε δεύτερη ημέρα. Όταν η πληρότητα της καλλιέργειας έφθασε το 90-100% (συνήθως την τρίτη ημέρα) τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν. Συγκεκριμένα, επώαστηκαν για περίπου 1min με 0,05% τρυψίνη και αφού αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του φρεατίου, μεταφέρθηκαν με αναλογία 1:2 σε τρυβλία των 6 φρεατίων, τα οποία ήταν επικαλυμένα με 0,1% ζελατίνη. Με τον τρόπο αυτό διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για 10 περίπου γενεές, κατά τις οποίες ο φαινότυπός τους παρέμενε σταθερός. Για τη δημιουργία ενός πιο ώριμου

φαινότυπου των cSMC, έγινε επαγωγή των διαφοροποιημένων hPSC-cSMC με 5ng/ml TGFβ1 (Peprotech) και 50units/ml ηπαρίνη στο ίδιο θρεπτικό μέσο, για 2 ημέρες.

Για να επιτύχουμε τη μετάβαση του συσταλτικού στον συνθετικό φαινότυπο των SMC (sSMC), τα hPSC-cSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια επικαλυμμένα με ζελατίνη και έπειτα από 24h έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε θρεπτικό μέσο που επάγει τη μετάβαση στα sSMC (SDM, Synthetic Differentiation Medium) και επώαση για 2 ημέρες. Το SDM αποτελείται από ένα βασικό θρεπτικό μέσο (ScienCell, 1201-b) εμπλουτισμένο με 2% FBS και BSA, apo-transferrin, ινσουλίνη, EGF, FGF-2, IGF-I και υδροκορτιζόνη (ScienCell, 1252). Εναλλακτικά, η αλλαγή του φαινότυπου επετεύχθει μόνο με την προσθήκη 2ng/ml FGF-2 (Immunotools, 11343623).

2.5 Λειτουργικές δοκιμασίες των hPSC-cSMC/sSMC

Προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των κυττάρων (των δύο φαινότυπων των SMC) που προέκυψαν από τη διαφοροποίηση των hPSC, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω δοκιμασίες.

2.5.1 Συσταλτότητα των hPSC-cSMC

40.000 hESC-cSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια τρυβλίου 24 φρεατίων επικαλυμμένα με ζελατίνη και καλλιεργήθηκαν σε CDM. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού σε DMEM απουσία ορού και παράλληλα με την προσθήκη 2μg/ml καλσεΐνης (eBioscience, 65-0853) σε αυτό, χρώση των κυττάρων. Έπειτα από 15min έγινε επαγωγή με $10^{-5}M$ καρβαχόλη (Sigma). Μία σειρά εικόνων λήφθηκε με τη χρήση της συσκευής IncuCyte (IncuCyte ZOOM 2016B), για τα επόμενα 30min, με τον s Plan Fuor ELWD 20X φακό. Μετρήθηκαν τα κύτταρα των οποίων η επιφάνεια μειώθηκε στα 30min (κύτταρα που συστάθηκαν) και υπολογίστηκε το ποσοστό τους έναντι του συνολικού αριθμού των κυττάρων στο συγκεκριμένο πεδίο. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 4 πεδία ανά φρεάτιο και σε συνολικά 6 φρεάτια ανά πείραμα.

2.5.2 Πολλαπλασιαστικό δυναμικό των hPSC-SMC

40.000 hPSC-cSMC και hPSC-sSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια τρυβλίου 24 φρεατίων επικαλυμμένα με ζελατίνη και καλλιεργήθηκαν σε CDM και SDM αντίστοιχα. 6h

αργότερα και αφού είχαν προσκολληθεί, έγινε μία πλύση με PBS και επώαση σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 2% FBS. Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων ($t=0h$) με την προσθήκη 0,2% trypan blue (Sigma, T815) σε 3 φρεάτια ανά συνθήκη. Η καταμέτρηση επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο έπειτα από 24 και 48h. Για την ανάλυση υπολογίστηκε ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων από 3 φρεάτια, για κάθε χρονικό σημείο, σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα.

2.5.3 Μεταναστευτική ικανότητα των hPSC-SMC

Η ικανότητα των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC να μεταναστεύουν ελέγχθηκε με τη μέθοδο επούλωσης τραύματος (wound healing assay). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επιστρώθηκαν, εις τριπλούν, σε φρεάτια τρυβλίου 24 φρεατίων επικαλυμένα με ζελατίνη και όταν κάλυψαν όλη την επιφάνεια του φρεατίου προκλήθηκε ένα "τραύμα" με τη χρήση ρύγχους πιπέτας 200μl. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα αποκολλημένα κύτταρα και καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 0,5% FBS. Λήφθηκαν φωτογραφίες των κυττάρων κάθε 1h με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (TIRFM). Η μέτρηση των κυττάρων που μετανάστευσαν προκειμένου να καλύψουν την επιφάνεια του τραύματος πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ. Για κάθε ανεξάρτητο πείραμα αξιολογήθηκε η μετανάστευση σε τουλάχιστον 3 φρεάτια, για κάθε συνθήκη.

2.5.4 Ενεργότητα μεταλλοπρωτεϊνών των hPSC-SMC

Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ζυμογραφίας ώστε να προσδιοριστεί η ενεργότητα των MMPs με δράση γελατινών τόσο σε κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των κυττάρων. Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια τρυβλίου 24 φρεατίων επικαλυμένα με ζελατίνη και καλλιεργήθηκαν σε CDM και SDM αντίστοιχα. Μετά από 24h πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού σε DMEM απουσία ορού και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72h. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16.100rcf για 20min και η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με τη χρήση του BCA Protein kit (Thermo Fisher Scientific, 23225). Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν και

φυγοκεντρήθηκαν στα 1.000rcf για 10min, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, με την ίδια συνολικά ποσότητα πρωτεϊνών, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμπλουτισμένο με 1mg/ml ζελατίνη, στους 4°C. Η ποσότητα των υπερκειμένων υπολογίστηκε αναλογικά με τη συγκέντρωση πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Ακολούθησαν δύο πλύσεις των πηκτωμάτων με διάλυμα που περιείχε 2,5% Triton X-100, 50mM Tris-HCL pH7,5, 5mM CaCL₂, 1μM MgCL₂ και επώαση με διάλυμα 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCL pH7,5, 5mM CaCL₂, 1μM MgCL₂ στους 37°C ολονυκτίως. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση του πηκτώματος με coomassie blue (40% methanol, 10% acetic acid, 0,5g/100ml Coomassie blue) για 30min, εμφάπτηση σε dH₂O και αποχρωματισμός με διάλυμα αποτελούμενο από 40% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ, έως ότου εμφανιστούν σαφώς οι αποχρωματισμένες ζώνες. Οι περιοχές ενζυμικής δραστηριότητας (γελατινόλυσης) εμφανίστηκαν ως λευκές ζώνες σε σκούρο μπλε φόντο. Λήφθηκαν εικόνες από ολόκληρα τα πηκτώματα, μετατράπηκαν σε ασπρόμαυρες και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν έτσι ώστε οι περιοχές της ενζυμικής δραστηριότητας να φαίνονται ως μαύρες ζώνες (αντιστράφηκαν). Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Quantity One.

2.5.5 Ολιγοδυναμία των hPSC-SMC

Ελέγχθηκε η ικανότητα των hPSC-cSMC να διαφοροποιούνται περαιτέρω προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα. Για τη διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα 0,03x10⁶ κύτταρα επιστρώθηκαν σε φρεάτιο τριβλίου 6 φρεατίων και έγινε επαγωγή αυτών με ADSC θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100nM dexamethasone, 0,05mM L-ascorbic acid-2-phosphate και 10mM β-glycerophosphate. Πραγματοποιούνταν αλλαγή του μισού όγκου του θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες για 21 ημέρες. Για τη διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 0,25x10⁶ κύτταρα σε 3D καλλιέργεια και έγινε απαγωγή αυτών με DMEM εμπλουτισμένο με 100μg/ml sodium pyruvate, 40μg/ml proline, 50μg/ml L-ascorbic acid-2-phosphate, 1mg/ml BSA, 1xinsulin–transferrin–selenium, 100nM

dexamethasone και 10ng/ml TGF- β 3. Πραγματοποιούνταν αλλαγή του μισού όγκου του θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες για 21 ημέρες [236].

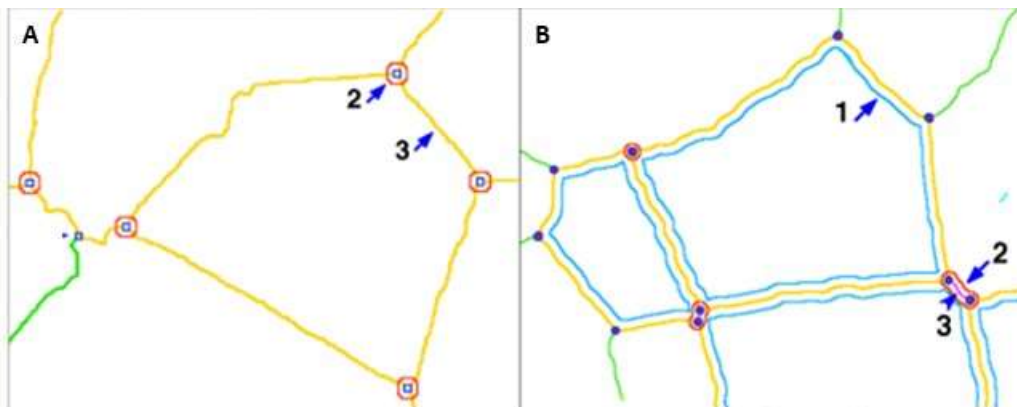
Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας των διαφοροποιήσεων πραγματοποιήθηκαν χρώσεις ιστοχημείας. Συγκεκριμένα, περιοχές ασβεστοποίησης που επιβεβαιώνουν τη διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα εντοπίστηκαν έπειτα από χρώση με Alizarin Red. Για τη χρώση αυτή απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο και έγινε μία πλύση των τρυβλίων με PBS. Έπειτα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 10% φορμαλδεύδη για 20min, σε θερμοκρασία δωματίου και έγιναν δύο πλήσεις με ddH₂O. Ακολούθησε χρώση με 2% Alizarin Red σε ddH₂O για 20min σε θερμοκρασία δωματίου και δύο πλήσεις με PBS. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ελέγχθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν. Τέλος, η έκφραση των γλυκοζαμινογλυκανών (sGAGs) που υποδηλώνουν τη διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα επιβεβαιώθηκε μέσω χρώσης με Alcian blue [236], ακολουθώντας ένα ανάλογο πρωτόκολλο, με τη διαφορά ότι αντί για Alizarin Red προστέθηκε Alcian blue.

2.5.6 Δοκιμασία *in vitro* αγγειογένεσης

Για τη δημιουργία αγγειακού δικτύου *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν τα πλακίδια μ-Slide Angiogenesis (ibidi, 81501), στα οποία αφού προστέθηκαν 10μl matrigel σε κάθε φρεάτιο, επώαστηκαν στους 37°C για 1h ώστε αυτό να πολυμεριστεί. Τα hPSC-cSMC/sSMC και τα EC σημάνθηκαν με τις φθορίζουσες μεμβρανικές χρωστικές PKH26 και PKH67 αντίστοιχα (Ενότητα 2.9) και με μία αναλογία 1:9 (hPSC-SMC:EC) προστέθηκαν στην υδρογέλη του matrigel και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο EGM-2 (Lonza, CC-3156). Λήφθηκαν εικόνες από ολόκληρο το φρεάτιο κάθε 2h για έως και 3 ημέρες με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου Leica SP5. Τα μορφωμετρικά χαρακτηριστικά του σχηματισθέντος δικτύου (Εικόνα 2.2) αξιολογήθηκαν με το εργαλείο Angiogenesis Analyzer της εφαρμογής Fiji-ImageJ (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzerfor-ImageJ&lang=en&artpage=6-6>). Πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 επαναλήψεις για κάθε συνθήκη σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα.

2.5.7 Επαγωγή της οργάνωσης των EC σε δίκτυο κατά τη συγκαλλιέργειά τους με τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC σε 2D

Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC επιστρώθηκαν σε τρυβλίο (ibidi) καλυμμένο με 0,1% ζελατίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν όλη τη διαθέσιμη επιφάνεια προστέθηκαν 40.000 EC (HUVEC) και πραγματοποιήθηκε αλλαγή σε θρεπτικό μέσο EGM-2, που επιτρέπει την ομαλή ανάπτυξη και των δύο τύπων κυττάρων. Μετά από 4 ημέρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3,7% PFA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός (Ενότητα 2.10), κατά τον οποίο τα EC διακρίθηκαν με αντίσωμα έναντι του ενδοθηλιακού δείκτη CD31 και τα hPSC-SMC με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SM22. Τέλος, έγινε παρατήρηση του σχηματιζόμενου δικτύου με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5, όπου λήφθηκαν εικόνες από ολόκληρο σχεδόν το τρυβλίο. Η αξιολόγηση των μορφωμετρικών χαρακτηριστικών του σχηματισθέντος δικτύου (Εικόνα 2.2) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ.



Εικόνα 2.2 Μορφωμετρικά χαρακτηριστικά του σχηματιζόμενου δικτύου. Το δίκτυο των EC και των EC+hPSC-SMC αναλύθηκε μέσω του λογισμικού ImageJ. Δομές του δικτύου που μελετώνται αποτελούν οι εξής: *nodes*, δηλαδή κόμβοι που έχουν τουλάχιστον 3 "γείτονες" (A2), *Junctions*, δηλαδή, κόμβοι που είναι ενωμένοι (B2,3), *segments*, τμήματα που ξεκινάνε από ένα *junction* (A3) και *meshes* που αντιστοιχεί στο συνολικό πλέγμα που οριοθετείται από την ένωση των *segments* με τα *junctions* (B1 γαλάζιο χρώμα).

2.6 Δημιουργία αγγειακών οργανοειδών

2.6.1 Παρασκευή μεθυλοκυτταρίνης

Η προετοιμασία του διαλύματος της μεθυλοκυτταρίνης είναι πολύ σημαντική, γιατί αν η συγκέντρωσή του είναι πολύ χαμηλή ή αν υπάρχουν αδιάλυτα υπολείμματα μεθυλοκυτταρίνης μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος των σχηματιζόμενων σφαιροειδών. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίστηκαν 6g αποστειρωμένης σκόνης μεθυλοκυτταρίνης και τοποθετήθηκαν σε μία φλάσκα των 500ml μαζί με ένα

μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250ml ενός βασικού θρεπτικού μέσου (DMEM) που ήταν προθερμασμένο στους 60°C και αναδευτήκαν για 20min, ώστε να διαλυθεί η σκόνη. Τότε, προστέθηκαν άλλα 250ml από το ίδιο θρεπτικό μέσο, που ήταν σε θερμοκρασία δωματίου και αναδευτήκαν για 1-2h. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε κωνικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρήθηκε για 2h στα 5000g, σε θερμοκρασία δωματίου. Μόνο το υπερκείμενο ήταν κατάλληλο για χρήση, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέους κωνικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

2.6.2 Δημιουργία αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών

Κάθε αγγειακό οργανοειδές (σφαιροειδές αποτελούμενο από hPSC-SMC και EC) και σφαιροειδές (αποτελούμενο μόνο από EC) συνολικού όγκου 10μl, αποτελείται από 80% μεθυλοκυτταρίνη και από 20% διάλυμα κυττάρων (κύτταρα σε EGM-2 θρεπτικό μέσο). Στην πλειονότητα των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν σφαιροειδή που αποτελούνταν συνολικά από 1.000 κύτταρα, με μία αναλογία hPSC-SMC/EC 1:9. Ωστόσο, δημιουργήθηκαν και σφαιροειδή που αποτελούνταν από 1.000 κύτταρα με μία αναλογία hPSC-SMC/EC 1:12, καθώς και σφαιροειδή με αναλογία hPSC-SMC/EC 1/9 και συνολικά 100, 2.500 ή 10.000 κύτταρα. Προκειμένου να μπορούν να διακριθούν κατά τη μικροσκόπηση οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί στα αγγειακά οργανοειδή, τα κύτταρα σημάνθηκαν με φθορίζουσες μεμβρανικές χρωστικές (Ενότητα 2.9) είτε αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω ανοσοφθορισμού (Ενότητα 2.10).

Για τον σχηματισμό των σφαιροειδών εφαρμόστηκε η τεχνική των κρεμάμενων σταγόνων. Συγκεκριμένα, 10μl από το μίγμα κυττάρων/μεθυλοκυτταρίνης μεταφέρθηκαν με μορφή σταγόνας στην εσωτερική επιφάνεια από το καπάκι ενός πιάτου διαμέτρου 10cm (Corning, 430167). Η διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια από το καπάκι με σταγόνες, κρατώντας ασφαλή απόσταση ανάμεσά τους, ώστε να μην ενωθούν. Στη συνέχεια, το καπάκι αναστράφηκε με προσοχή και τοποθετήθηκε στην κανονική του θέση πάνω από τη βάση του τρυβλίου. Στη βάση του τρυβλίου προστέθηκαν 10ml PBS, ώστε να εξασφαλιστεί η απαραίτητη υγρασία. Τέλος, το τρυβλίο μεταφέρθηκε, με προσοχή, στον επωαστήρα των 37°C.

2.7 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή *in vitro*

2.7.1 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε *matrigel*

Μία ημέρα πριν τη μεταφορά των αγγειακών οργανοειδών στο matrigel (Corning, 354234), αυτό μεταφέρθηκε στους 4°C μέσα σε πάγο, ώστε να αποψυχθεί βραδέως κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα 10μl matrigel μεταφέρθηκαν προσεκτικά, χωρίς να σχηματισθούν φυσαλίδες, σε τρυβλία μ-slide angiogenesis (ibidi, 81501). Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο, χρησιμοποιώντας κρύα ρύγχη πιπετών, ώστε να αποφευχθεί ένας γρήγορος πολυμερισμός πριν την τοποθέτηση στα φρεάτια. Για τη διατήρηση της απαραίτητης υγρασίας, δεδομένων των μικρών όγκων, το τρυβλίο αυτό μεταφέρθηκε μέσα σε ένα μεγαλύτερο τρυβλίο, διαμέτρου 10cm, όπου και τοποθετήθηκε ενυδατωμένο χαρτί. Όλη η “κατασκευή” μεταφέρθηκε στους 37°C και επώαστηκε για 60min. Έπειτα, σε κάθε φρεάτιο μεταφέρθηκε ένα αγγειακό οργανοειδές με 40μl EGM-2 θρεπτικού. Γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες, ενώ καθημερινά ελέγχονταν η δημιουργία εκβλαστήσεων. Λήφθηκαν φωτογραφίες με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 και η ποσοτικοποίηση των εκβλαστήσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ.

2.7.2 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης

Κολλαγόνο I επώαστηκε για 30min στον πάγο. 88,6μl μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf και εμπλουτίστηκαν με την προσθήκη 10μl DMEM 10X (Sigma, M0275). Στη συνέχεια, έγινε ρύθμιση του pH του διαλύματος ώστε να είναι ουδέτερο, με την προσθήκη 1-2μl NaOH 10N, δίνοντας τελικά ένα ροζ χρώμα στο διάλυμα. Για τον εμπλουτισμό της υδρογέλης με φιμπρονεκτίνη, προστέθηκε 1μl φιμπρονεκτίνης (100ng/ml). Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε αυστηρά στον πάγο, για την αποφυγή πολυμερισμού. Μετά από πολύ καλή ανάδευση 50μl του διαλύματος μεταφέρθηκαν ταχύτατα σε φρεάτια τρυβλίου 96 φρεατίων και επώαστηκαν στους 37°C για 30min. Τέλος, τα αγγειακά οργανοειδή (σφαιροειδή αποτελούμενα από hPSC-SMC+EC) και τα σφαιροειδή (αποτελούμενα από EC) μεταφέρθηκαν επάνω στις υδρογέλες που είχαν σχηματισθεί και προστέθηκε

EGM-2 θρεπτικό μέσο. Μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα (37°C, 5% CO₂) και παρατηρούνταν καθημερινά. Λήφθηκαν εικόνες με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (TIRFM) και η ποσοτικοποίηση των εκβλαστήσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ.

2.7.3 Δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε υδρογέλη ινωδογόνου

Η δημιουργία της υδρογέλης ινωδογόνου πραγματοποιήθηκε απευθείας εντός των φρεατίων τρυβλίου 96 φρεατίων, καθώς ο πολυμερισμός συνέβαινε ταχύτατα και ήταν δύσκολη η μεταφορά του διαλύματος από πλαστικά σωληνάκια τύπου erpendorf στο τρυβλίο. Σε κάθε φρεάτιο το διάλυμα που θα πολυμεριστεί είχε τελικό όγκο 50μl. Αρχικά προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος θρομβίνης, ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0,64u/ml και στη συνέχεια προστέθηκε το ινωδογόνο με τελική συγκέντρωση 2mg/ml. Πραγματοποιήθηκε επώαση 5min σε θερμοκρασία δωματίου και 20min στους 37°C ώστε να πολυμεριστεί και να σχηματιστεί η υδρογέλη και ακολούθησε η μεταφορά των αγγειακών οργανοειδών και των σφαιροειδών σε θρεπτικό μέσο EGM-2.

2.8. Δοκιμασία *in vivo* αγγειογένεσης

Η δυνατότητα σχηματισμού νέων ώριμων αιμοφόρων αγγείων από τα αγγειακά οργανοειδή *in vivo*, διερευνήθηκε με τη δοκιμασία εμφύτευσης τους με matrigel (matrigel plug assay) σε ποντικούς. Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Μελετών Ζωικών Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (14144). Όλες οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Οδηγία 2010/63 της ΕΕ). Ελήφθησαν όλα τα κατάλληλα μέτρα για την ελαχιστοποίηση του πόνου ή της δυσφορίας των ζώων. Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια NSG (NOD/SCID) ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Τα ζώα στεγάστηκαν σε ξεχωριστά αεριζόμενους κλωβούς, με έναν κύκλο 12h φωτός/σκότους, απουσία παθογόνων παραγόντων, έχοντας απεριόριστη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από hPSC-SMC/EC, σφαιροειδή αποτελούμενα από EC (300/ζώο) είτε μονήρη κύτταρα (300.000 hPSC-SMC/EC ή EC/ζώο) αναμείχθηκαν με 200μl ψυχρού matrigel (Corning, 354234) που περιείχε

200ng/ml VEGF, 800ng/ml FGF-2 και 0,1ng/ml ηπαρίνης και εγχύθηκε υποδόρια στην κοιλιακή χώρα κατά μήκος της περιτοναϊκής μεσαίας γραμμής των ποντικών. 4 ημέρες μετά την ένεση οι ποντικοί θανατώθηκαν και τα εμφυτεύματα matrigel αφαιρέθηκαν, μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεΐδη, ενσωματώθηκαν σε διάλυμα OCT (Optimal cutting temperature) και ψύχθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ζώα ανά ομάδα, αριθμός που καθορίστηκε από την ανάλυση με το λογισμικό G Power.

2.9 Μεμβρανική χρώση κυττάρων

Για να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των hPSC-cSMC/sSMC και των EC σε δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν μαζί, τα κύτταρα σημάθηκαν με 2 διαφορετικές φθορίζουσες μεμβρανικές χρωστικές, PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich) και PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich). Οι συγκεκριμένες χρωστικές, όντας λιπόφιλες, προσδένονται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης όπου υπάρχουν λιπίδια. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν κοινό και για τις δύο χρωστικές. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονταν σε καλλιέργεια επώαστηκαν με 0,05% τρυψίνη, αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου και μεταφέρθηκαν σε κωνικό σωλήνα των 15ml. Φυγοκεντρήθηκαν για 5min στα 1.500rpm και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 3ml ενός θρεπτικού μέσου το οποίο δεν περιείχε ορό (DMEM/F-12) και φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 5min στα 1.500rpm. Η απουσία ορού ήταν απαραίτητη, καθώς πρωτεΐνες που περιέχονται σε αυτόν δεσμεύουν τη χρωστική, ελαττώνοντας έτσι την ποσότητα που ήταν διαθέσιμη για τα κύτταρα. Σε ένα πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf προστέθηκαν 500μl διαλύματος (diluent buffer) και 2μl κόκκινης ή 4μl πράσινης χρωστικής (οι ποσότητες αυτές ήταν επαρκείς για να βάψουν έως 2×10^7 κύτταρα). Το διάλυμα αυτό προστέθηκε στο ίζημα των κυττάρων, όπου αναμείχθηκαν καλά και επώαστηκαν για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml ορού και επώαστηκαν για 1min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να δεσμευθεί η περίσσεια της χρωστικής. Έπειτα, προστέθηκε 1ml θρεπτικού μέσου EGM-2 και φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 1.500rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 3ml EGM-2 θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν και με τη χρήση της Neubauer υπολογίστηκε ο ακριβής αριθμός τους.

2.10 Ανοσοφθορισμός

Προσκολλημένα κύτταρα: Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες, εντός τρυβλίου 24 φρεατίων ή γενικότερα σε τρυβλία κατάλληλα για μικροσκοπία. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε πλύση με PBS και προστέθηκε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε δεύτερη πλύση με PBS και επώαση με 50mM NH₄Cl (σε PBS) για άλλα 15min. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση με Triton-X 0,1% (σε PBS) για 4min, ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και επώαση με 10% FBS για 20min, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε 10% FBS για 1h (Πίνακας 2.1). Με το πέρας της επώασης, ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS των 5min, υπό ανάδευση, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Έπειτα, προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 10% FBS και επωάστηκε για 1h (Πίνακας 2.1). Πραγματοποιήθηκαν άλλες 2 πλύσεις με PBS των 5min υπό ανάδευση. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα ProLong Gold antifade (Invitrogen) και η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe.

Αγγειακά οργανοειδή: αγγειακά οργανοειδή ή σφαιροειδή που αποτελούνταν από 1.000 κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με διάλυμα 0,2% Triton-X/0,9% ζελατίνης για 1h και ακολούθως με διάλυμα 0,5% Triton-X/0,9% ζελατίνης για 15min. Έπειτα, επωάστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα ολονυκτίως, στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση (Πίνακας 2.1). Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκαν 5 πλύσεις με 0,2% Triton-X και επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα για 1h (Πίνακας 2.1). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 5 πλύσεις με 0,2% Triton-X και επώαση με το Draq5 (ThermoFisher Scientific) για 10min. Λήφθηκαν εικόνες με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5.

2.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα λήφθηκαν με διάλυμα PBS pH 7,0 που περιείχε 1% SDS και 100μM αναστολέα πρωτεασών phenyl methane sulphonyl fluoride (PMSF). Στη συνέχεια, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier), 2 φορές για 10sec (13% amplitude) και έπειτα βρασμό στους 100°C για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.200rpm για 20min και συλλογή του υπερκλειμένου. Με τη χρήση του BSA Protein kit και ενός φωτομέτρου υπολογίστηκε η συγκέντρωση των συνολικών πρωτεϊνών που περιείχε κάθε δείγμα. Με βάση την τιμή αυτή υπολογίστηκε η ποσότητα κάθε δείγματος που περιείχε μία σταθερή ποσότητα ολικών πρωτεϊνών και μεταφέρθηκε σε νέα πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf. Σε αυτά προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1x, εμπλουτισμένο με 0,025% β-μερκαπτοαιθανόλη (Gibco, 21985). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών αυτών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της αποτύπωσης, έγινε προσωρινή χρώση της νιτροκυτταρίνης με 0,1% PonceauS για 5min και η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνθηκε με νερό. Ακολούθησε επώαση για 20min με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα western (10mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% Tween-20, και 150mM NaCl), για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων και επώαση των μεμβρανών με τα πρωτογενή αντισώματα, αραιωμένα σε 5% άπαχο γάλα ή 2% ζελατίνη (Gelatin from cold water fish skin, Sigma, 063K0777) σε διάλυμα western. Η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα πραγματοποιήθηκε για τουλάχιστον 1h σε θερμοκρασία δωματίου, είτε ολονυκτίως στους 4°C. Στην συνέχεια, ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις με διάλυμα western και τρεις πλύσεις των 10min στο ίδιο διάλυμα, υπό ανάδευση. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Radish Peroxidase, HRP) διαλυμένα σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα western, για 1h, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του σήματος πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

2.12 Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

Η μέθοδος βασίζεται στη χαρακτηριστική διασπορά του φωτός και του φθορισμού που επιδεικνύει κάθε κύτταρο. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν ενζυμικά, με τη χρήση 0,05% τρυψίνης, μεταφέρθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf με διάλυμα PBS εμπλουτισμένο με 2% FBS και 1mM EDTA και φυγοκεντρήθηκαν για 5min στα 1.200rpm. Στη συνέχεια, επαναιωρήθηκαν στο ίδιο διάλυμα με τελική συγκέντρωση 200.000 κύτταρα/40μl. Σε όγκο κυττάρων 40μl προστέθηκε το ή τα αντισώματα που ήταν σημασμένα με φλουορόχρωμα (FITC-Fluorescein isothiocyanate είτε PE-Phycoerythrin ή APC-Allophycocyanin) και πραγματοποιήθηκε επώαση σε πάγο, απουσία φωτός για 30min (Πίνακας 2.2). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl PBS, έγινε επαναιώρηση των κυττάρων, φυγοκέντρωση για 5min στα 1.600rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 1ml PBS και μεταφέρθηκε σε κωνικό φιαλίδιο των 1,5ml κατάλληλο για χρήση στη συσκευή κυτταρομετρίας ροής CyFlow (Partec, Münster, Germany). Συλλέχθηκαν τουλάχιστον 20.000 συμβάντα από κάθε δείγμα και η ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του λογισμικού FlowMax.

2.13 Απομόνωση και έλεγχος RNA

2.13.1 Απομόνωση RNA

Το συνολικό RNA των κυττάρων απομονώθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG). Η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με το NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) και παράλληλα ελέγχθηκε η ποιότητά του μέσω του λόγου της απορρόφησης των δειγμάτων στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm. Δείγματα για τα οποία ο λόγος 260/280 ήταν μεταξύ 1,8-2 θεωρούνται υψηλής καθαρότητας και αναλύθηκαν περαιτέρω.

2.13.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Reverse Transcription-Polymerase

Chain Reaction, qRT-PCR). Η μέθοδος qRT-PCR επιτυγχάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας (kit) QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, 204243) ενός σταδίου. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνται οι παρακάτω αντιδράσεις:

1^ο στάδιο: Αντίστροφη μεταγραφή. Σε αυτό το πρώτο στάδιο παράγεται το συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) με την παρουσία ενός μίγματος ανάστροφων μεταγραφασών (omniscrypt & sensiscrypt).

2^ο στάδιο: παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA του συγκεκριμένου γονιδίου με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με HotStarTaq DNA πολυμεράση. Η συγκεκριμένη DNA πολυμεράση έχει την ιδιότητα να παραμένει ανενεργή, χωρίς καμία ενζυμική δράση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ένζυμο ενεργοποιείται από ένα βήμα 15min επώασης στους 95°C, το οποίο προστίθεται πριν από το κλασικό πρόγραμμα της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία της ασύμμετρης κυανής χρωστικής SYBR Green I, η οποία έχει την ιδιότητα να δένεται στο δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορίζον σήμα. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση διαφορετικών στόχων χωρίς να χρειάζεται ανιχνευτής (probe) με ειδική αλληλουχία. Η χρωστική SYBR Green I εμφανίζει μήκος διέγερσης στα 494nm και εκπομπής στα 521nm. Η αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας του κάθε στόχου εξαρτάται από τον κύκλο στον οποίο παρατηρείται αύξηση του φθορισμού (threshold cycle, Ct). Συνεπώς, με την qRT-PCR είναι δυνατή η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, με τη χρήση γνωστών συγκεντρώσεων αρχικού RNA που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό πρότυπης λογαριθμικής καμπύλης φθορισμού, $Ct = \alpha \log(\text{συγκέντρωσης})$.

2.14 Ανοσοϊστοχημεία

Τα εμφυτεύματα αφαιρέθηκαν από τα ζώα, ενσωματώθηκαν σε διάλυμα OCT, ψύχθηκαν και κόπηκαν σε τομές των 5μm, με τη χρήση της Thermo Shandon E κρουτόμου. Πραγματοποιήθηκε χρώση με ιωσίνη και αιματοξυλίνη σε όλα τα δείγματα, καθώς και χρώση με τα ειδικά αντισώματα CD31, CD34 και αSMA

χρησιμοποιώντας το EnVision™ FLEX, High pH, (Link) (K8000). Συγκεκριμένα, οι τομές ενυδατώθηκαν σε ddH₂O, εκθέθηκαν σε 3% H₂O₂ για 10min σε θερμοκρασία δωματίου, επώαστηκαν για 1h με τα πρωτογενή αντισώματα και ακολούθως με το δευτερογενές EnVision FLEX /HRP (DAKO) για 30min. Εικόνες λήφθηκαν με το Olympus BX-50 μικροσκόπιο. Για την ποσοτικοποίηση των αγγειακών δομών και των επιμέρους χαρακτηριστικών τους, αξιολογήθηκαν τουλάχιστον 5 πεδία από κάθε τομή και συνολικά τουλάχιστον 3 τομές για κάθε εμφύτευμα.

2.15 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα SPSS 22.0 (SPSS, Inc). Οι μεταβλητές με συνεχή δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι \pm τις τιμές τυπικής απόκλισης. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας προκειμένου να εφαρμοστούν το T-test ή Mann–Whitney test για τη σύγκριση μεταξύ μέσων όρων δύο συνθηκών και ANOVA για τη σύγκριση μέσων όρων μεταξύ περισσότερων από δύο συνθηκών. Στην περίπτωση πολλαπλών συγκρίσεων, εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, ώστε να υπολογιστεί η τελική τιμή στατιστικής σημαντικότητας *P*. Στις ποιοτικές μεταβλητές, τα κατηγοριακά δεδομένα αντιστοιχίστηκαν σε κάποια τιμή και εφαρμόστηκε το χ^2 (chi-square) test. Οι τιμές του στατιστικού σφάλματος *P* που υπολογίστηκαν στον αμφίπλευρο έλεγχο (2-tailed) θεωρούνται στατιστικώς σημαντικές όταν ήταν μικρότερες από 0,05.

Πίνακας 2.1 Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη.

Όνομα αντισώματος	Κλώνος	Κατασκευαστής
p-PLC γ	S1248	Cell signaling, USA
p-ERK1/2	T202/Y204	Cell signaling, USA
p-elf2	S51	Cell signaling, USA
p-Akt-(ser)	S473	Cell signaling, USA
α SMA	1A4	Dako, USA
Calponin	CALP	Dako, USA

SM22α	Polyclonal	ABCAM, UK
Collagen IV	M3F7	DSHB, USA
Fibronectin	P1H11	DSHB, USA
CD31	JC70A	Dako, Denmark
VEGFR11	55B11	Cell signaling, USA
Von Willebrand Factor	Polyclonal	Dako, Denmark
CD34	QBEnd/10	ThermoFisher Scientific, USA
Nanog	Polyclonal	Cell Signaling, USA
Sox2	245610	R&D Systems, USA
Tubulin	E7	DSHB, USA
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Alexa Fluor® 594 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

Πίνακας 2.2 Σημασμένα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην μελέτη.

Όνομα αντισώματος	Κλώνος	Κατασκευαστής
CD29-PE	MEM-101A	Immunotools, Germany
CD73-PE	AD2	Biolegend, USA
CD105-PE	MEM-226	Immunotools, Germany
CD44-PE	MEM-85	Immunotools, Germany
NG2-APC	LHM-2	R&D systems, USA

CD31-PE	MEM-05	Immunotools, Germany
CD34-PE	4H11[APG]	Immunotools, Germany
VEGFR2	89106	R&D systems, USA
IgG1-PE	PPV-06	Immunotools, Germany
IgG2-PE	PPV-04	Immunotools, Germany
IgG1-APC	11711	R&D systems, USA

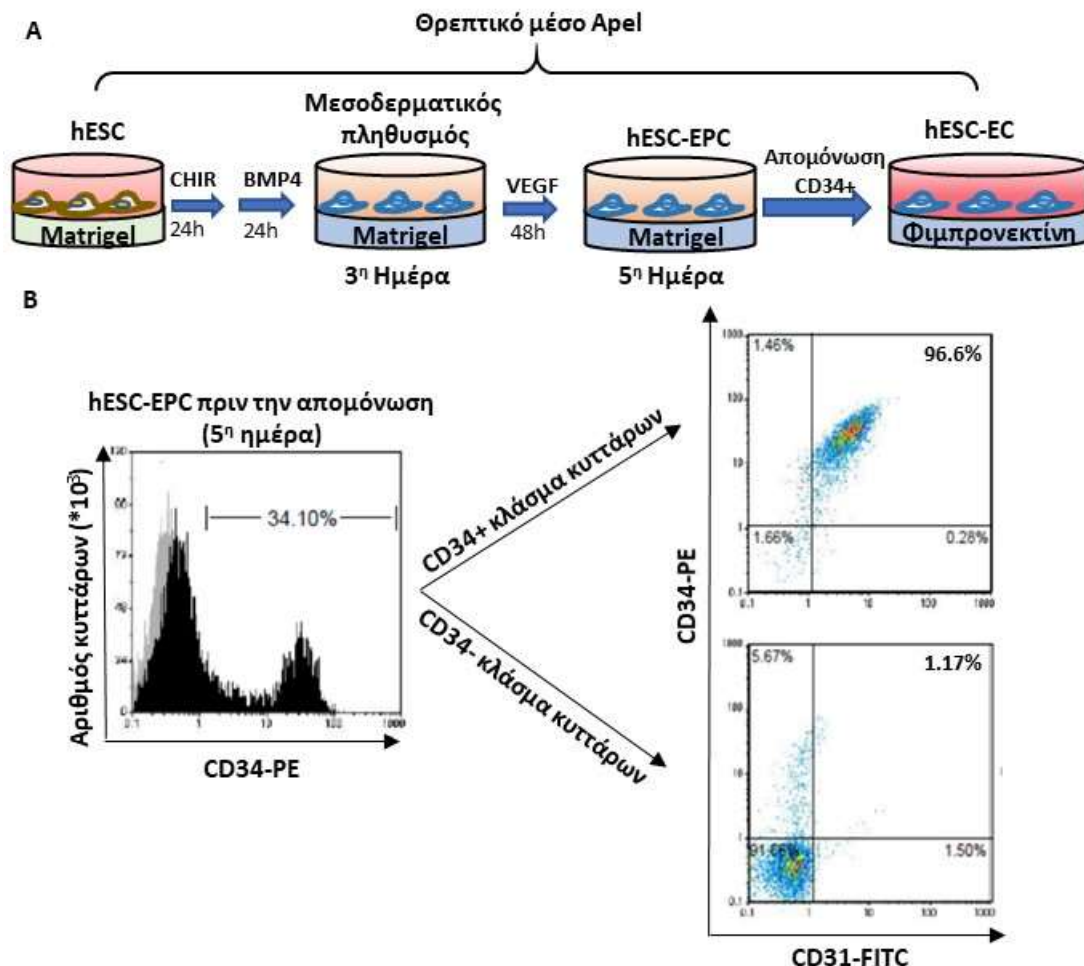
Πίνακας 2.3 Εκκινητές γονιδίων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη.

Όνομα γονιδίου	Αλληλουχία εμπρόσθιου (5'-3') εκκινητή	Αλληλουχία αντίστροφου (5'-3') εκκινητή
<i>Vegfr2</i>	CCATCTCAATGTGGTCAACCTTCT	TCCTCAGGTAAGTGGACAGGTTTC
<i>Vegfr1</i>	ACCGGGGTCCTGCTGTG	GCCTTTCGCTTTCCTTACTCA
<i>Vegfr3</i>	CCCGGCTGCCCTGAAGTG	GCGGCGTATGGCGGGAGTG
<i>Nrp1</i>	AACACCAACCCACAGATG	AAGTTGCAGGCTTGATTCG
<i>Nrp2</i>	CTGGAAGCAGCATTGTGTG	TAACTCGCTGATGGGGAGA
<i>Ephrinb2</i>	GAAGTACGAGCCCCACAGA	CCCAACGCAGAAATAAACG
<i>Ephrinb4</i>	GAAAAGGAAGTGCCCAACA	CTGGCAAGGGAGTCACACT
<i>Tie2</i>	GCCCAAGCCTTCCAAAAC	TGCCCTCCCAATCACAT
<i>hif</i>	AGCCGCTGGAGACACAA	GAGGGGAGCATTACATCATTAT
<i>Cd31</i>	GCATCGTGGTCAACATAACAGAA	GATGGAGCAGGACAGGTTTCAG
<i>Cd34</i>	GGACCGCGCTTTGCTTGCTGAG	GAAACGTTGGCTGGGGTGGTGAA
<i>Etv2</i>	CAGCTCTACCGTTTGCTC	AGGAACTGCCACAGCTGAAT
<i>NG2</i>	ACGGAAACGGAAGGTGTCC	CCAGGAAAGGCAACCTTCAAC
<i>SM22α</i>	CGAAGTGCAGTCCAAAATCGAGAA	AATCACGCCATTCTTCAGCCAGAC
<i>PDGFRβ</i>	ATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGAC	AGGACAGTGGGCGGTGGGTAGG
<i>SMMHC</i>	GGCAACGCCAAAACAGTGA	TCAATGTTGGCTCCCACGAT
<i>CD105</i>	CCCGCACCGATCCAGACCACTCCT	TGTCACCCCTGTCCTCTGCCTCAC
<i>CNN</i>	TCATCAAGGCCATCACCAAGT	AGGGTGGACTGCACCTGTGTA
<i>GABDH</i>	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	GAGTCCTCCACGATACCAAAG

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αναγνώριση του μεσοδερματικού πληθυσμού που ανταποκρίνεται στον VEGF και οδηγεί σε EPC

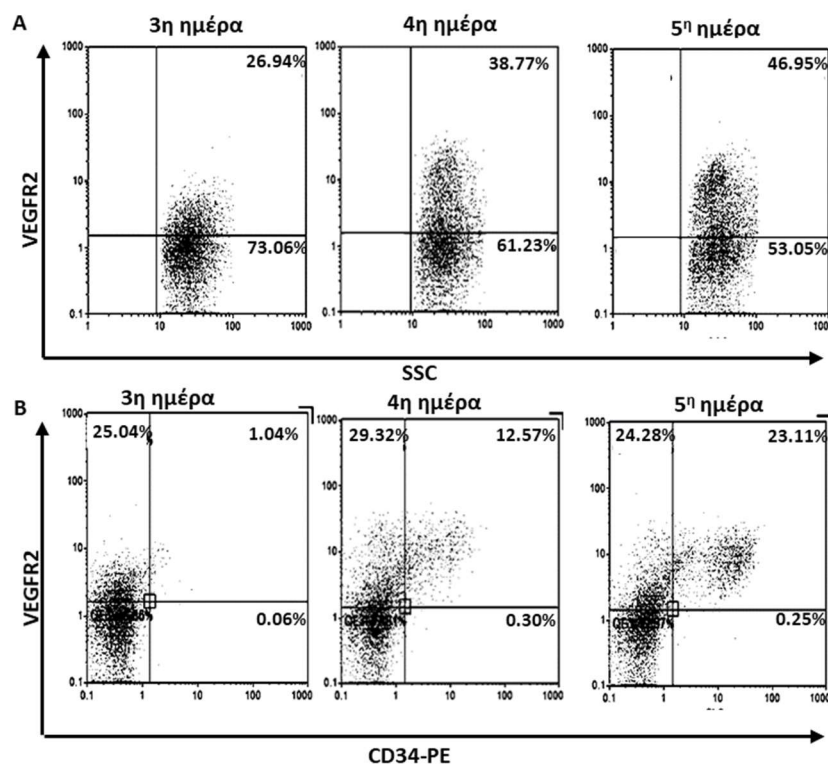
Για τη διαφοροποίηση των hESC σε EC χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο που είχε ήδη αναπτυχθεί από μέλη της ομάδας μας στο εργαστήριο [234] (Εικόνα 3.1). Όλη η πορεία της διαφοροποίησης λαμβάνει χώρα σε χημικά καθορισμένες συνθήκες (απουσία τροφοδοτικών κυττάρων και ξеноβιοτικών παραγόντων-ορού) και εξαρτάται από τη δράση του VEGF, αποτελώντας το ιδανικό πρωτόκολλο για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που επάγονται από τη δράση του παράγοντα αυτού.



Εικόνα 3.1 Διαφοροποίηση των hESC προς EC. **A.** Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου. **B.** Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει το δείκτη CD34 την 5η ημέρα της διαφοροποίησης, μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός που επώαστηκε με φθορίζον

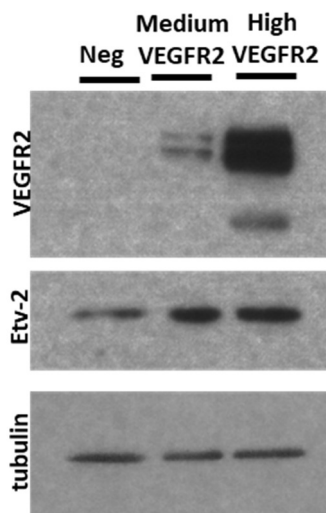
έναντι του δείκτη CD34 και με γκρι ο κυτταρικός πληθυσμός που επώαστηκε με το αντίστοιχο ισοτυπικό αντισώμα (*isotypic control*). Στη συνέχεια τα CD34+ κύτταρα απομονώθηκαν με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων και στα δύο κλασματα κυττάρων αξιολογήθηκε η παρουσία ή μη των CD34+ κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπως φαίνεται στα διαγράμματα διασποράς (δεξιά).

Για να διερευνήσουμε την επαγόμενη από τον VEGF σηματοδότηση που είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση των μεσοδερματικών κυττάρων σε EPC, θεωρήσαμε ότι πρέπει πρώτα να αναγνωρίσουμε τον μεσοδερματικό πληθυσμό (3^η ημέρα της διαφοροποίησης), που ανταποκρίνεται στον VEGF. Εφόσον μόνο ένα ποσοστό των κυττάρων (25-35%) διαφοροποιείται σε EPC, θεωρήσαμε πως αντίστοιχα μόνο ένα μέρος του μεσοδερματικού πληθυσμού ανταποκρίνεται στον VEGF δίνοντας αυτό το αποτέλεσμα. Δεδομένου ότι ο VEGFR-2 (ή KDR) είναι ο κύριος υποδοχέας του VEGF, αναλύθηκε η επιφανειακή έκφραση αυτού κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (ημέρα 3-5) μέσω κυτταρομετρίας ροής. Την 3^η ημέρα, πριν από την έκθεση σε VEGF, το 26% των κυττάρων εξέφραζε στην επιφάνειά του τον VEGFR-2 και αυτό το ποσοστό ήταν σχεδόν διπλάσιο την 5^η ημέρα (Εικόνα 3.2A). Παράλληλα ένα μέρος των κυττάρων που εξέφραζε τον VEGFR2 την 5^η ημέρα εξέφραζε και το CD34, δείκτη των EPC (Εικόνα 3.2B).



Εικόνα 3.2 Έπιφανειακή έκφραση του VEGFR2 και του CD34 κατά την πορεία διαφοροποίησης των hESC προς EC. Α. Η έκφραση του VEGFR2 αξιολογήθηκε από την 3^η έως την 5^η ημέρα διαφοροποίησης. Στα διαγράμματα διασποράς παρουσιάζονται τα κύτταρα που επωάστηκαν με το φθορίζον αντισώμα έναντι του VEGFR2 και αναλύθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής. **Β.** Η έκφραση του VEGFR2 και του CD34 αξιολογήθηκε από την 3^η έως την 5^η ημέρα διαφοροποίησης. Στα διαγράμματα διασποράς παρουσιάζονται τα κύτταρα που επωάστηκαν με τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι του VEGFR2 και του CD34 και αναλύθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα διαγράμματα διασποράς είναι αντιπροσωπευτικά από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Η απομόνωση και περαιτέρω ανάλυση των κυττάρων που εκφράζαν επιφανειακά τον VEGFR2 την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης, αποκάλυψε ότι τα κύτταρα αυτά συνεκφράζαν το μεταγραφικό παράγοντα *etv2* (Εικόνα 3.3), ο οποίος θεωρείται δείκτης δεσμευσης (commitment) των μεσοδερματικών κυττάρων στην ενδοθηλιακή σειρά [237].

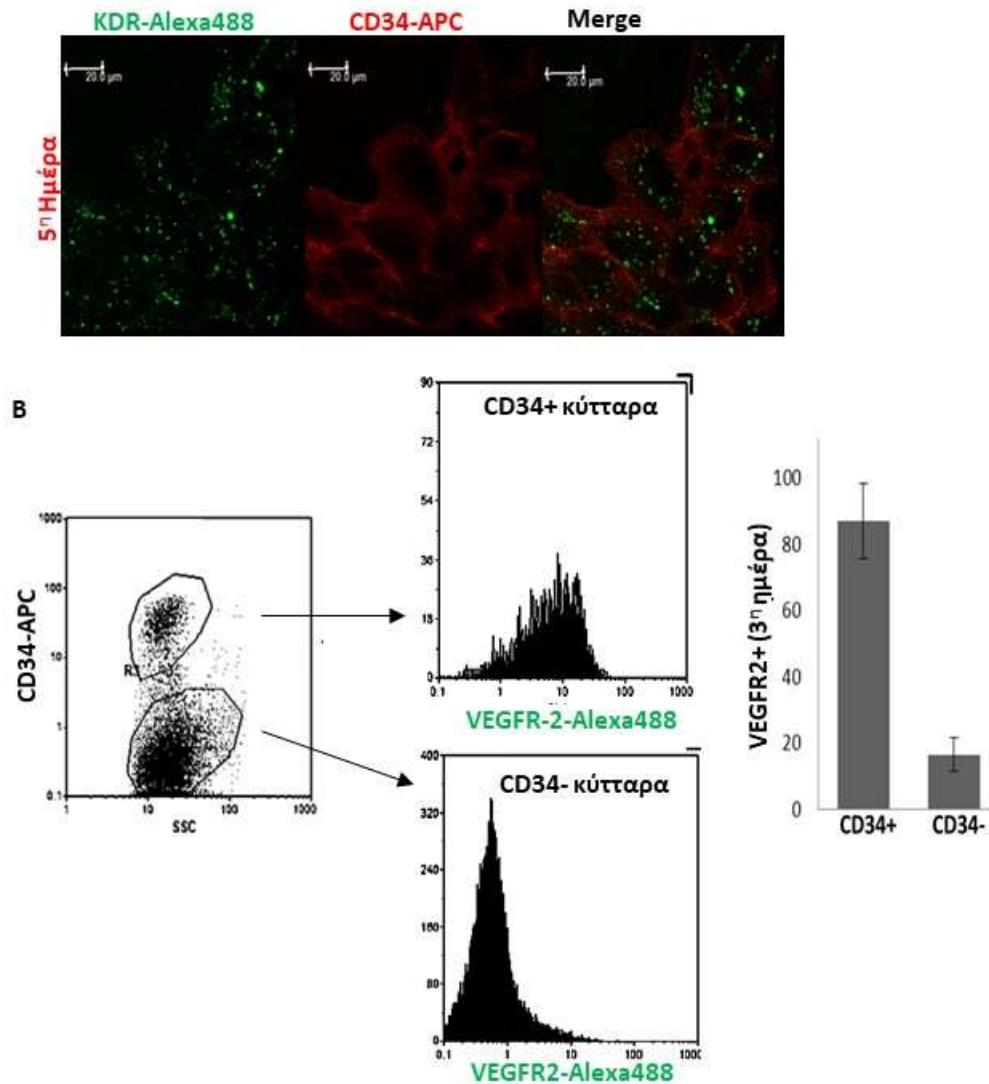


Εικόνα 3.3 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *etv2* στα μεσοδερματικά κύτταρα κατά την πορεία διαφοροποίησης των hESC προς EC. Τα μεσοδερματικά κύτταρα την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης διαχωρίστηκαν σε 3 κλάσματα σύμφωνα με την έκφραση του VEGFR2 σε αυτά, μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS sorter). Από τα 3 αυτά κλάσματα συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα έναντι των πρωτεϊνών VEGFR2 και *Etv-2*. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

3.1.1 Η πλειονότητα των EPC προέρχεται από μεσοδερματικά κύτταρα που εκφράζουν τον VEGFR2

Για να διερευνηθεί εάν τα παραγόμενα hESC-EPC (VEGFR2+, CD34+) προέρχονται από κύτταρα που εκφράζαν τον VEGFR-2 ήδη από την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης, τα μεσοδερματικά κύτταρα σημάνθηκαν με ένα φθορίζον (Alexa 488), μη λειτουργικό αντίσωμα έναντι του VEGFR-2 και ακολούθησε επαγωγή με VEGF. Το αντίσωμα αυτό δεσμεύεται και ενδοκυτταρώνεται μόνο από κύτταρα που εκφράζουν μόρια λειτουργικού VEGFR-2 στην επιφάνειά τους, ενώ ο φθορισμός του ήταν ανιχνεύσιμος έως και 2 ημέρες μετά, δηλαδή, μέχρι και την 5^η ημέρα της διαφοροποίησης (Εικόνα

3.4). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4, σχεδόν όλα τα hESC-EPC έφεραν και τον φθορισμό που προσδίδει το alexa488 φθοριόχρωμα, υποδηλώνοντας ότι προέρχονται από τον μεσοδερματικό πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης εξέφραζε τον VEGFR-2. Ωστόσο υπήρχε και ένα μικρό ποσοστό κυττάρων που εξέφραζε τον VEGFR-2 την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης, αλλά όμως δε διαφοροποιήθηκε σε EPC (CD34-) (Εικόνα 3.4B).



Εικόνα 3.4 Η πλειονότητα των EPC προέρχονται από τον VEGFR2+ μεσοδερματικό πληθυσμό. Α. Τα μεσοδερματικά κύτταρα την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης επωάστηκαν με το μη λειτουργικό αντίσωμα alexa 488-VEGFR. Η πορεία της διαφοροποίησης συνέχισε και τα κύτταρα την 5^η ημέρα μονιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι του CD34 και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα κύτταρα που εκφράζαν τον VEGFR2 ήδη από την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης και στα οποία είχε προσδεθεί το φθορίζον αντίσωμα VEGFR2-alexa 488, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει την έκφραση του CD34. **Β.** Κύτταρα που επωάστηκαν την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης με το VEGFR2-alexa 488 αντίσωμα αναλύθηκαν την 5^η ημέρα για την

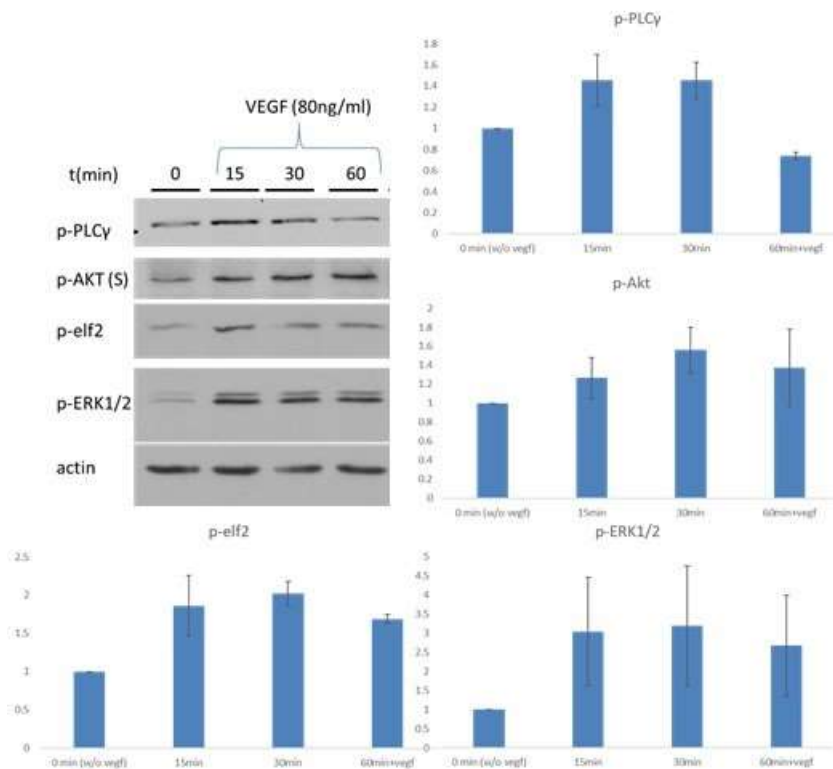
έκφραση του δείκτη CD34 μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής, όπως φαίνεται στα ιστογράμματα. Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό των CD34+ και CD34- κυττάρων που είχαν σημειωθεί με το VEGFR2-αλεξα 488 αντίσωμα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 2 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες να απομονωθεί ο μεσοδερματικός πληθυσμός των κυττάρων που εκφράζαν τον VEGFR2 μέσω κυτταρομετρία ροής (facs sorter). Ωστόσο η δυσκολία να προσκολληθούν ξανά σε μία σειρά υποστρωμάτων (matrigel, φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο), δε μας επέτρεψε την απομόνωση και την περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου υποπληθυσμού. Επομένως, στη συνέχεια στραφήκαμε για τη μελέτη της μεταγωγής του σήματος του VEGF στον συνολικό μεσοδερματικό πληθυσμό.

3.2 Μελέτη της μεταγωγής του σήματος του VEGF στον συνολικό-μεικτό μεσοδερματικό πληθυσμό που οδηγεί σε EPC κατά τη διαφοροποίηση των hESC σε EC

3.2.1 Ο VEGF επάγει τη φωσφορυλίωση γνωστών καθοδικών στη μεταγωγή του σήματος πρωτεϊνών

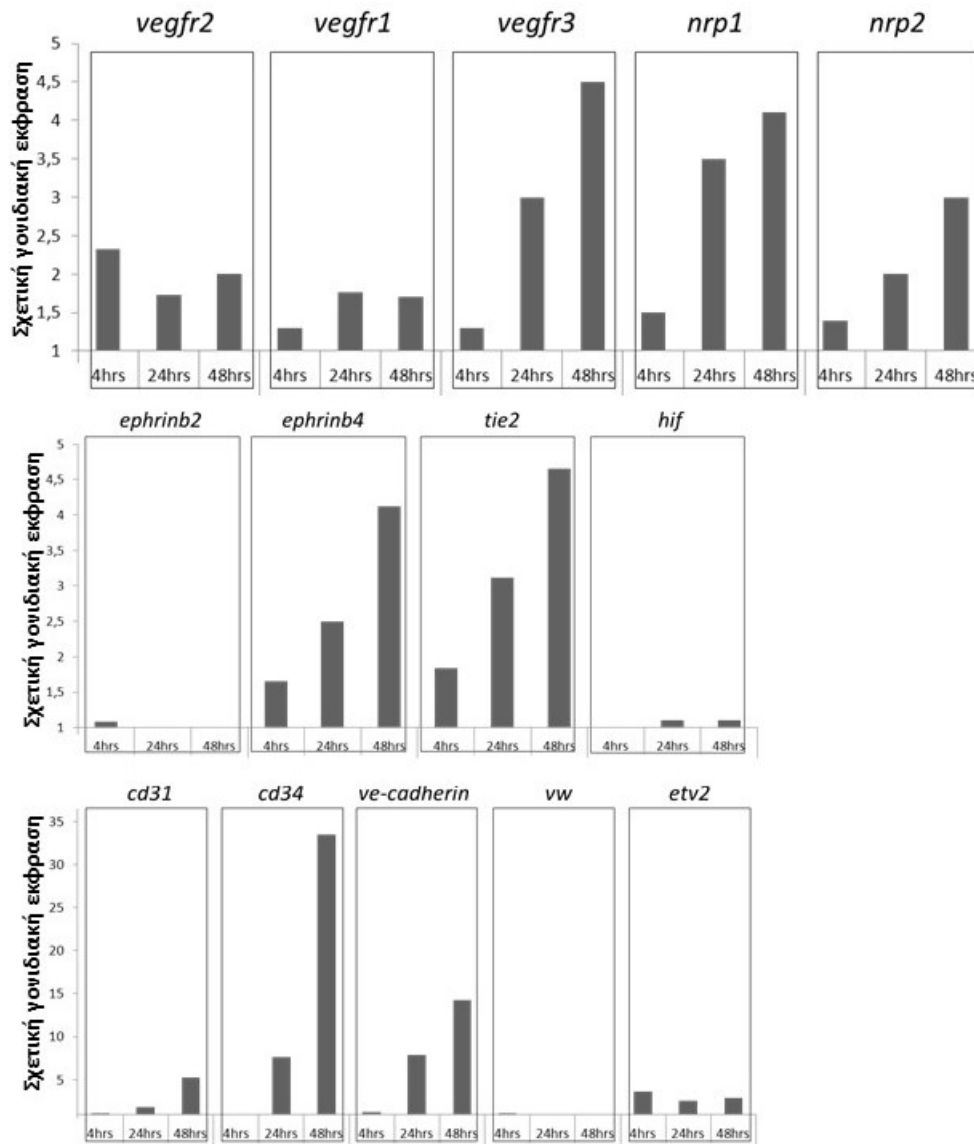
Για τη μελέτη της μεταγωγής του σήματος που επάγεται από τον VEGF κατά τη διαφοροποίηση των hESC προς EPC και πιο συγκεκριμένα κατά τη μετάβαση των μεσοδερματικών κυττάρων σε EPC, έγινε επαγωγή των μεσοδερματικών κυττάρων την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης με 80ng/ml VEGF για 15, 30, 60min και ακολούθησε λύση των κυττάρων. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western, με σκοπό τη διερεύνηση της δράσης του VEGF στη φωσφορυλίωση βασικών πρωτεϊνών που είναι γνωστό ότι βρίσκονται καθοδικά αυτού και συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούνται από τη δράση του σε πρωτογενή EC. Ο VEGF επάγει τη φωσφορυλίωση όλων των πρωτεϊνών που ελέγχθηκαν (pAKT, pERK, pPLCγ, pELF2) (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Η επαγωγή της φωσφορλίωσης γνωστών καθοδικών στη μεταγωγή του σήματος πρωτεϊνών από τον VEGF. Έγινε επαγωγή των μεσοδερματικών κυττάρων την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης των hESC προς EPC με 80ng/ml VEGF για 15, 30 και 60min. Συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πριν αλλά και μετά την προσθήκη του VEGF και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών p-PLCγ, p-AKT, p-elf2 και p-ERK1/2. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών για κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζεται στα γραφήματα. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει την ένταση της ζώνης της εκάστοτε φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης που κανονικοποιήθηκε με την ένταση της ζώνης της ακτινής (έλεγχος ισοφόρτωσης) και εκφράζεται ως μεταβολή σε σχέση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στα κύτταρα πριν την επαγωγή με VEGF. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 2 ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.2 Ο VEGF επάγει τη μεταγραφή χαρακτηριστικών γονιδίων της ενδοθηλιακής σειράς κατά τη μετάβαση των μεσοδερματικών κυττάρων σε EPC

Σε επίπεδο μεταγραφής και σε μεταγενέστερο χρόνο (4, 24 και 48h μετά από την επαγωγή με VEGF), διερευνήθηκε η επαγωγή μιας ομάδας γονιδίων που είναι χαρακτηριστικά της ενδοθηλιακής σειράς. Ολικό RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε μέσω qRT-PCR. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.6 ο VEGF επάγει την έκφραση των υποδοχέων του, καθώς και δεικτών των EC (VE-CADHERIN, CD31, CD34, TIE2, ETV2). Ωστόσο, η έκφραση του παράγοντα von Willebrand, δείκτη ωρίμανσης των EC δεν αυξήθηκε, επιβεβαιώνοντας τον προγονικό χαρακτήρα των EPC.



Εικόνα 3.6 Επαγωγή της μεταγραφής χαρακτηριστικών γονιδίων της ενδοθηλιακής σειράς από τον VEGF. Έγινε επαγωγή των μεσοδερματικών κυττάρων την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης των ESC προς EPC με 80ng/ml VEGF για 4, 24 και 48h. Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα αυτά, καθώς και από τα μεσοδερματικά κύτταρα πριν από την προσθήκη του VEGF και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των γονιδίων *vegfr3*, *vegfr2*, *vegfr1*, *nrp1*, *nrp2*, *ephrinb2*, *ephrinb4*, *tie2*, *hif*, *cd31*, *cd34*, *ve-cadherin*, *vwf* και *etv2*, με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το διάγραμμα παρουσιάζει τη μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων αυτών πριν και μετά την επαγωγή με τον VEGF.

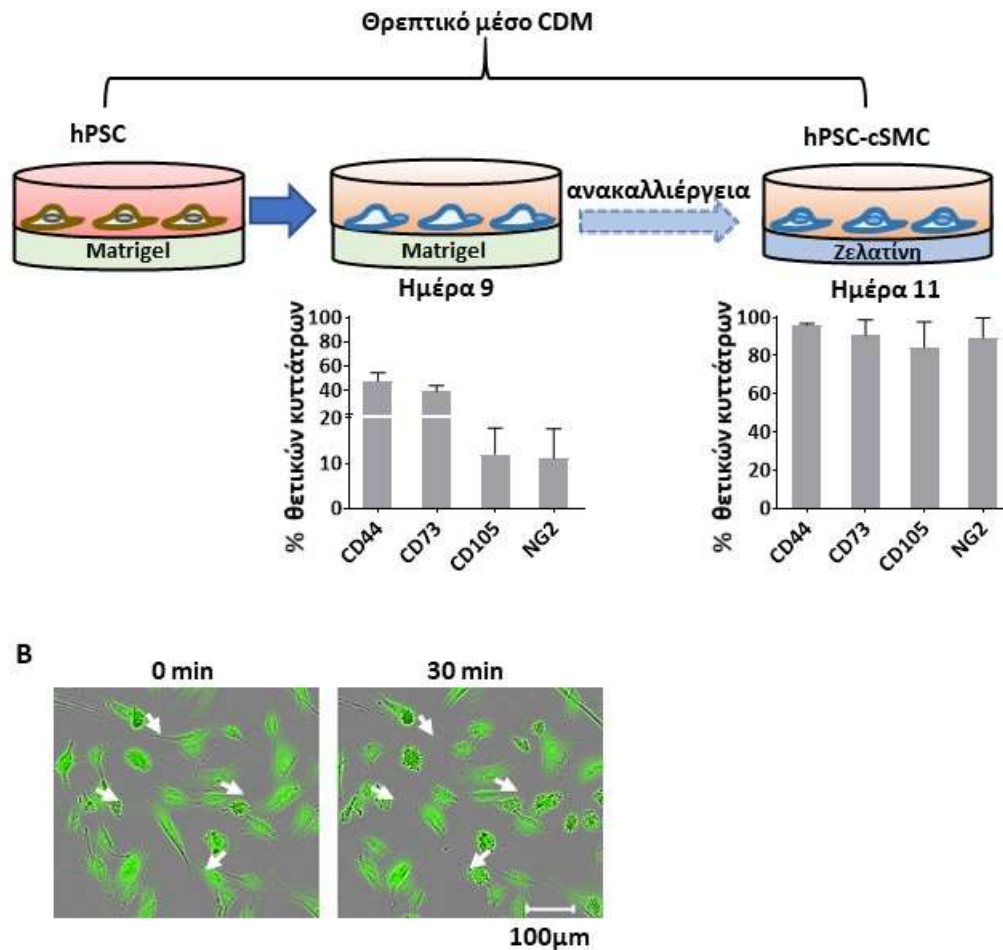
3.3 Διαφοροποίηση των hPSC σε δύο διακριτούς φαινότυπους των SMC

3.3.1 Διαφοροποίηση των hPSC προς τον συσταλτικό φαινότυπο των SMC

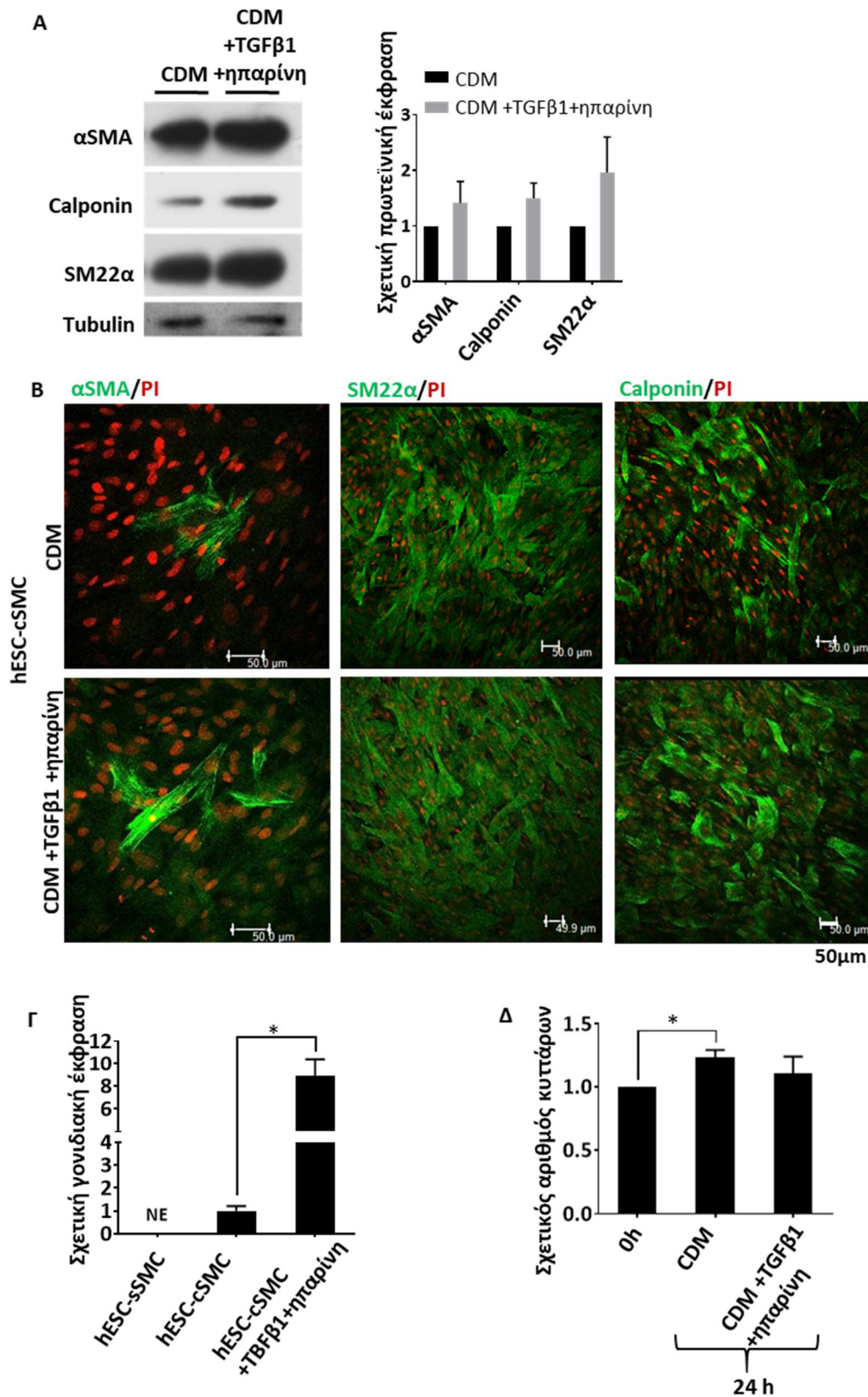
Για τη δημιουργία των cSMC αναπτύχθηκε ένα απλό και σύντομο πρωτόκολλο διαφοροποίησης των hPSC (hESC, hiPSC), απουσία τροφοδοτικών κυττάρων, με χαμηλό ποσοστό ορού, που όπως είναι γνωστό, επάγει την έκφραση συσταλτικών πρωτεϊνών [238], χαρακτηριστικές των κυττάρων αυτών. Έπειτα από 9 ημέρες καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο CDM, ένας διακριτός πληθυσμός εξέφραζε τον τυπικό μεσεγχυματικό δείκτη CD44 ($48,3 \pm 0,6\%$) και ένα μικρότερο ποσοστό κυττάρων ήταν θετικό για τους γενικούς μεσοδερματικούς δείκτες CD73[239] [192] ($35,9 \pm 3,2\%$), CD105 ($11,4 \pm 0,6\%$) και NG2 ($14,4 \pm 3,3\%$) (Εικόνα 3.7A). Τα κύτταρα αυτά, εν συνεχεία, χωρίς διαλογή μεταφέρθηκαν σε φρεάτια επικαλυμμένα με ζελατίνη και ανακαλλιεργήθηκαν σε CDM. Όταν κάλυψαν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (2-3 ημέρες) εξέφραζαν σχεδόν καθολικά τους τυπικούς κοινούς δείκτες των MSC και των MC, CD44, CD73, CD105, και NG2 (Εικόνα 3.7A), συστέλλονταν μετά από επώαση με έναν χολινεργικό αγωνιστή (καρβαχόλη) ($78,4\% \pm 0,04$) (Εικόνα 3.7B) και επίσης, εκφράζαν σε υψηλά επίπεδα τις συσταλτικές πρωτεΐνες α SMA, Calponin, SM22a (Εικόνα 3.8A,B). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, υποδηλώνουν την επιτυχή διαφοροποίηση και των δύο πολυδύναμων κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στο συσταλτικό φαινότυπο των SMC. Ο φαινότυπος αυτός παρέμενε σταθερός για τουλάχιστον 8 γενεές (Εικόνα 3.9).

Η πρωτεΐνη *SMMHC* αποτελεί τον τυπικότερο δείκτη ωρίμανσης των cSMC. Στα hESC-cSMC η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή ήταν ανιχνεύσιμη, σε χαμηλό όμως επίπεδο, υποδηλώνοντας έναν μη ώριμο φαινότυπο των κυττάρων. Εφόσον έχει αποδειχθεί ότι ο TGFβ1 και η ηπαρίνη παίζουν ρόλο στην ωρίμανση των vSMC [240], επιχειρήσαμε να επάγουμε την ωρίμανση των hPSC-cSMC εκθέτοντάς τα στους παράγοντες αυτούς. Πράγματι, 24h μετά από την επαγωγή, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη γονιδιακή έκφραση του *SMMHC* (9 φορές) (Εικόνα 3.8Γ). Ταυτόχρονα αυξήθηκε η έκφραση και των υπόλοιπων συσταλτικών πρωτεϊνών (α SMA, Calponin, SM22a), χωρίς όμως η αύξηση αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική (Εικόνα 3.8A,B). Παράλληλα, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων που εκτέθηκαν σε TGFβ1/ηπαρίνη ήταν μειωμένο σε σύγκριση με τα

hESC-cSMC (Εικόνα 3.8Δ), γεγονός που, επίσης, υποδηλώνει την απόκτηση ενός πιο ώριμου φαινότυπου των hESC-cSMC [238].

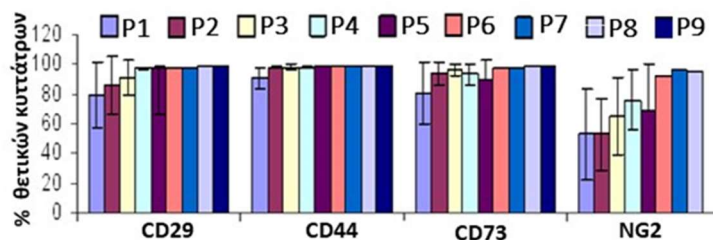


Εικόνα 3.7 Διαφοροποίηση των hPSC σε cSMC. **A.** Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου διαφοροποίησης των hPSC σε cSMC. Την 9^η και την 11^η ημέρα διαφοροποίησης των hESC προς cSMC ελέγχθηκε σε αυτά η έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD44, CD73, CD105 και NG2. Στα γραφήματα απεικονίζεται το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τους δείκτες αυτούς, όπως αξιολογήθηκε μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. **B.** Συσταλτική ικανότητα των hESC-cSMC. Τα hESC-cSMC αφού σημάνθηκαν με καλσεΐνη εκτέθηκαν σε καρμπαχόλη και βιντεοσκοπήθηκαν. Στις εικόνες παρουσιάζονται οι φωτογραφίες που ελήφθησαν πριν (0min) και 30min μετά την προσθήκη καρμπαχόλης. Ορισμένα από τα κύτταρα που συστάθηκαν υποδεικνύονται με λευκά βέλη. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.8 Επώαση των hESC-cSMC με TGFβ1 και ηπαρίνη επάγει την ωρίμανσή τους. **A, B** Τα hESC-cSMC που εκτέθηκαν σε TGFβ1 και ηπαρίνη εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών. **A.** Τα hESC-cSMC καλλιεργήθηκαν σε CDM ή σε CDM εμπλουτισμένο με TGFβ1 και ηπαρίνη για 48h. Συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αSMA, Calponin και SM22α. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών για κάθε συστατική

πρωτεΐνη παρουσιάζεται στο γράφημα. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει την ένταση της ζώνης κάθε συσταλτικής πρωτεΐνης που κανονικοποιήθηκε με την ένταση της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφόρτωσης) και εκφράζεται ως μεταβολή σε σχέση με την έκφραση στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε CDM. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 2 ανεξάρτητων πειραμάτων. **Β.** Τα hESC-cSMC καλλιεργήθηκαν σε CDM ή σε CDM εμπλουτισμένο με TGFβ1 και ηπαρίνη για 48h, επάνω σε καλυπτρίδες κατάλληλες για μικροσκοπία. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες αSMA, SM22α και calponin και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα κύτταρα που εκφράζαν τις πρωτεΐνες αυτές, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει τους πυρήνες (χρώση με PI). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από 3 ανεξάρτητα πειράματα. **Γ.** Ολικό RNA απομονώθηκε από τα hESC-cSMC, τα hESC-cSMC που εκτέθηκαν σε TGFβ1 και ηπαρίνη και τα hESC-sSMC και αναλύθηκε ως προς την έκφραση του γονιδίου SMMHC, με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το διάγραμμα παρουσιάζει τη σχετική έκφραση του γονιδίου στις διαφορετικές συνθήκες. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0,05, NE:μη ανιχνεύσιμο. **Δ.** Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των hPSC-cSMC και των hESC-cSMC που εκτέθηκαν σε TGFβ1 και ηπαρίνη για 48h. Ο ίδιος αριθμός των hESC-cSMC που καλλιεργήθηκαν σε CDM και των hESC-cSMC που καλλιεργήθηκαν σε CDM εμπλουτισμένο με TGFβ1 και ηπαρίνη για 48h, επιστρώθηκε σε φρεάτια επικαλυμμένα με ζελατίνη. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε έπειτα από 24h καλλιέργειας σε κοινό θρεπτικό μέσο (DMEM 2% FBS). Στο γράφημα παρουσιάζεται ο σχετικός αριθμός των κυττάρων αρχικά (t=0) και μετά από 24h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05.



Εικόνα 3.9 Σταθερότητα του φαινοτύπου των hESC-cSMC. Τα hESC-cSMC που καλλιεργούνταν σε CDM θρεπτικό μέσο ανακαλλιεργήθηκαν για έως και 9 γεννεές, κατά τις οποίες μελετήθηκε η έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD29, CD44, CD73 και NG2. Στο γράφημα απεικονίζεται το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει τους δείκτες αυτούς, όπως αξιολογήθηκαν μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.3.2 Διαφοροποίηση των hPSC προς τον συνθετικό φαινότυπο των SMC

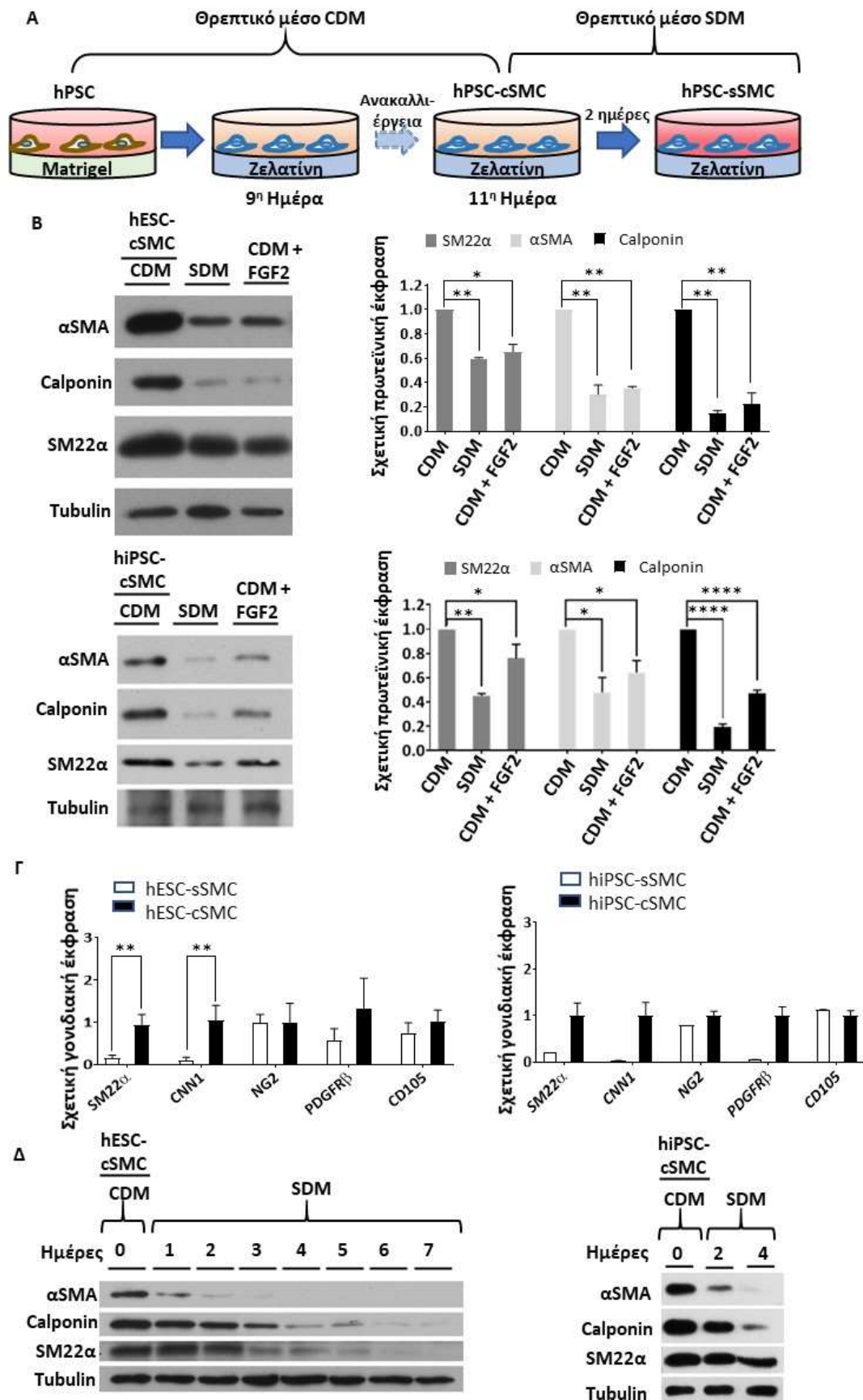
Για να επιτύχουμε την μετάβαση από τον συσταλτικό στον συνθετικό φαινότυπο των SMC (sSMC), τα hPSC-cSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια επικαλυμμένα με ζελατίνη και έπειτα από 24h έγινε επαγωγή με τον αυξητικό παράγοντα FGF2 (2ng/ml), παράγοντας που είναι γνωστό ότι επάγει τη φαινοτυπική μετάβαση των πρωτογενών cSMC σε sSMC [241]. Έπειτα από 2 ημέρες έκθεσης σε FGF2 τα επίπεδα έκφρασης

των συστατικών πρωτεϊνών μειώθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει την ανάπτυξη του συνθετικού φαινότυπου (Εικόνα 3.10B). Επειδή και άλλοι αυξητικοί παράγοντες [242] έχουν ένα παρόμοιο αποτέλεσμα με τον FGF, καταστέλλουν, δηλαδή, την έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών, επιλέχθηκε η καλλιέργεια των hPSC-cSMC σε ένα βασικό θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% FBS, εμπλουτισμένο με ένα σύνολο αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των FGF2, EGF, IGF-I (SDM) προκειμένου να επιτευχθεί επιτυχώς η διαφοροποίησή τους προς sSMC. Πράγματι, παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης των συστατικών πρωτεϊνών σε μεταφραστικό (Εικόνα 3.10B) και μεταγραφικό επίπεδο (Εικόνα 3.10Γ), σε σημείο που ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμες μετά από 3 ημέρες (Εικόνα 3.10Δ). Ομοίως υπήρχαν στατιστικώς σημαντικά λιγότερα hPSC-sSMC (αντίστοιχα με τα MSC που προέρχονταν από λιπώδη ιστό) που εκφράζαν αSMA, Calponin, SM22α σε σύγκριση με τα hPSC-cSMC (Εικόνα 3.11A,B), όπως φάνηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού και τη μικροσκόπηση. Τέλος, τα hPSC-sSMC εκφράζαν σχεδόν καθολικά τους δείκτες CD29, CD44, CD73, CD105, NG2, χωρίς να εντοπίζεται κάποια σημαντική μεταβολή στην επιφανειακή έκφραση τους σε σχέση με τα hPSC-cSMC (Εικόνα 3.11Γ).

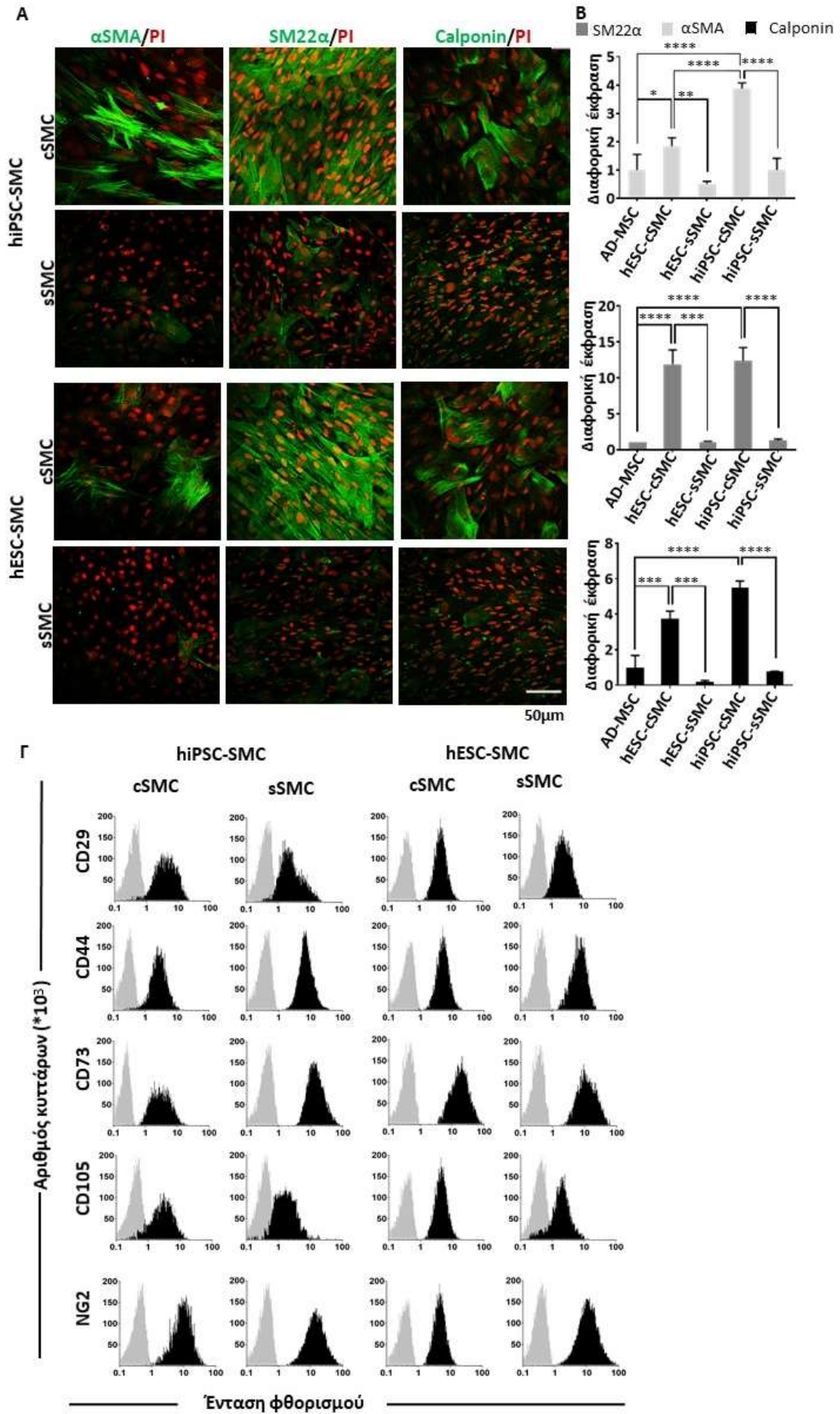
Ωστόσο, η επαναφορά των sSMC σε καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο CDM επανέφερε την έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών στα πρώτερα επίπεδα επιβεβαιώνοντας το δυναμικό τους φαινότυπο (Εικόνα 3.12).

Τέλος, οι δείκτες πολυδυναμίας *nanog* και *sox2*, που χαρακτηρίζουν τα hESC και τα hiPSC, δεν ήταν ανιχνεύσιμοι σε κανέναν από τους δύο φαινότυπους των

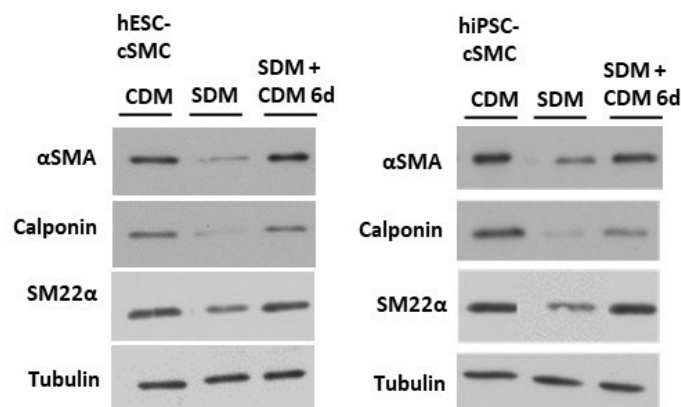
διαφοροποιημένων κυττάρων από την πρώτη κιάλας ανακαλλιέργεια αυτών (hPSC-cSMC και hPSC-sSMC) (Εικόνα 3.13).



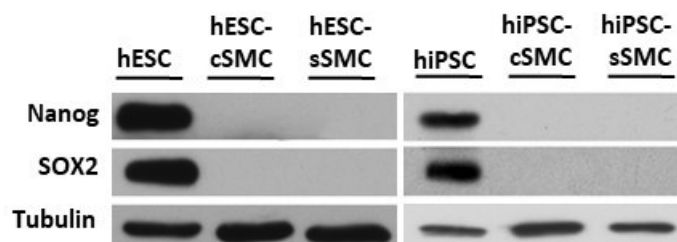
Εικόνα 3.10 Διαφοροποίηση των hPSC σε sSMC. **A.** Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου. **B.** Τα hESC-cSMC (επάνω) και τα hiPSC-cSMC (κάτω) καλλιεργήθηκαν περαιτέρω σε CDM, SDM ή CDM εμπλουτισμένο με FGF2, που καταστέλλει την έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών, για 48h. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών α SMA, Calponin και SM22a. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών για κάθε συστατική πρωτεΐνη παρουσιάζεται στα γραφήματα. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει την ένταση της ζώνης της εκάστοτε συστατικής πρωτεΐνης που κανονικοποιήθηκε με την ένταση της ζώνης της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφόρτωσης) και εκφράζεται ως μεταβολή σε σχέση με την έκφραση στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε CDM. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. **Γ.** Τα hESC-cSMC και τα hESC-sSMC καλλιεργήθηκαν σε CDM και SDM αντίστοιχα (αριστερά). Ομοίως τα hiPSC-cSMC και hiPSC-sSMC (δεξιά). Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα αυτά, ποσοτικοποιήθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των γονιδίων SM22a, CNN1, NG2, PDGFRB και CD105 με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το διάγραμμα παρουσιάζει τη σχετική έκφραση των γονιδίων αυτών στους 2 τύπους κυττάρων. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0,01$. **Δ.** Τα hESC-cSMC (αριστερά) και τα hiPSC-cSMC (δεξιά) καλλιεργήθηκαν σε CDM (ημέρα 0), είτε έγινε επαγωγή αυτών με SDM από 1 έως και 7 ημέρες. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών α SMA, Calponin και SM22a. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.



Εικόνα 3.11 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC. Α. Τα hESC-cSMC, hiPSC-cSMC και τα hESC-sSMC, hiPSC-sSMC καλλιεργήθηκαν σε CDM ή SDM αντίστοιχα, επάνω σε καλυπτρίδες κατάλληλες για μικροσκοπία. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες α SMA, SM22 α και calponin και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα κύτταρα που εκφράζαν τις πρωτεΐνες αυτές, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει τους πυρήνες (χρώση με PI). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. **Β.** Γραφήματα που παρουσιάζουν τους σχετικούς αριθμούς των hESC-cSMC, hESC-sSMC, hiPSC-cSMC και hiPSC-sSMC ως προς τα AD-MSC, που εκφράζαν τις πρωτεΐνες α SMA, SM22 α και Calponin. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα πειράματα ανοσοφθορισμού (Α). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,001$. **Γ.** Ελέγχθηκε η έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD44, CD73, CD105 και NG2 στα hESC-cSMC, hESC-sSMC και στα hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC, μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί που επώαστηκαν με τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των δεικτών CD29, CD44, CD73, CD105, NG2 και με γκρι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που επώαστηκαν με τα αντίστοιχα ισοτυπικά αντισώματα (isotypic controls). Κάθε ιστογράμμο αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.12 Τα hPSC-sSMC μπορούν να μεταθούν στο φαινότυπο των hPSC-cSMC. Τα hESC-cSMC (αριστερά) και hiPSC-cSMC (δεξιά) καλλιεργήθηκαν σε CDM και σε SDM ώστε να γίνει η μετάβαση σε hESC-sSMC και hiPSC-sSMC αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα hESC-sSMC και τα hiPSC-sSMC καλλιεργήθηκαν εκ νέου σε CDM για 6 ημέρες. Συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών α SMA, Calponin και SM22 α . Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Εικόνα αντιπροσωπευτική από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



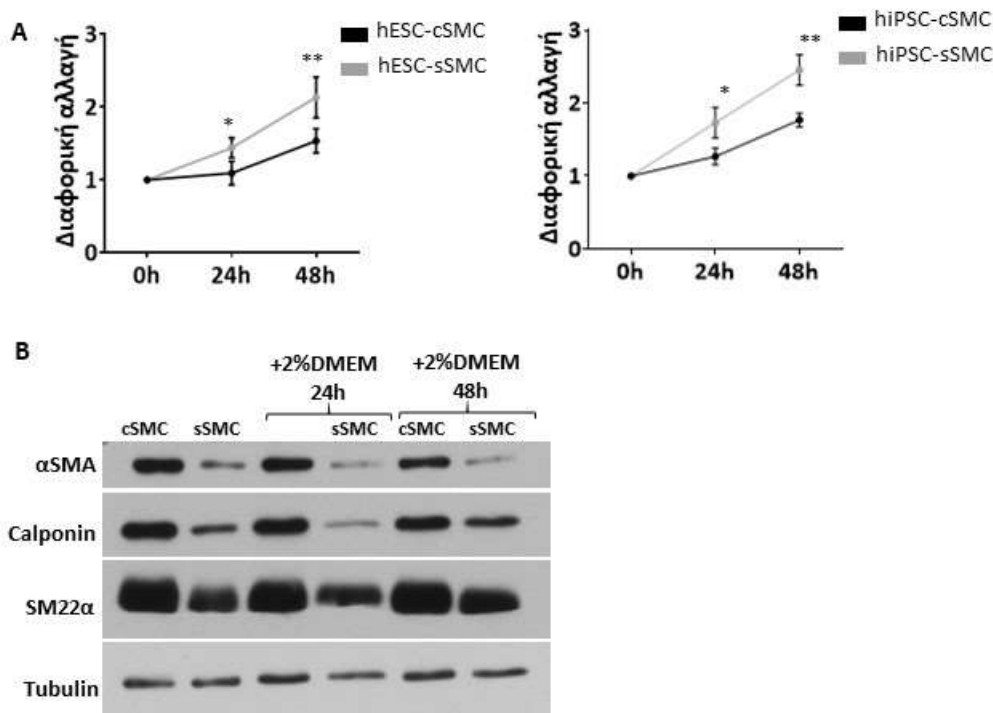
Εικόνα 3.13 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC δεν εκφράζουν δείκτες πολυδυναμίας. Τα hESC, hiPSC καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο mTeSR, διατηρώντας την πολυδυναμία τους, είτε διαφοροποιήθηκαν προς hESC-cSMC, hESC-sSMC (αριστερά) και hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC

(δεξιά). Συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών *Nanog* και *Sox2*. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Εικόνα αντιπροσωπευτική από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

3.4 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC *in vitro*

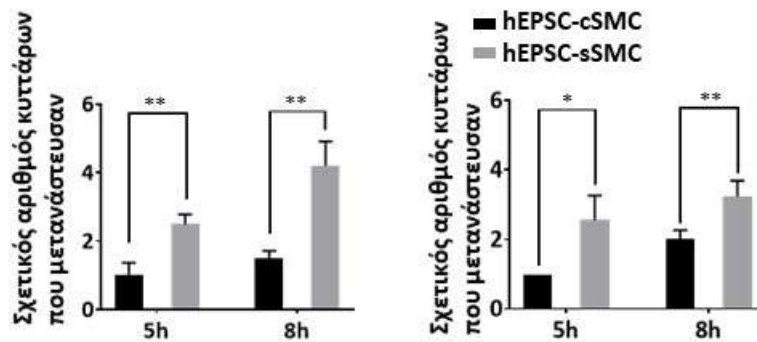
3.4.1 Τα hPSC-cSMC εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση σε σχέση με τα hPSC-sSMC

Προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμασίες που εξέταζαν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Καλλιεργώντας τους δύο τύπους κυττάρων σε ένα κοινό θρεπτικό μέσο, το οποίο δεν επηρέαζε το φαινότυπό τους, παρατηρήσαμε ότι τα hPSC-sSMC εμφάνιζαν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.14) και μετανάστευσης (Εικόνα 3.15) σε σχέση με τα hPSC-cSMC.



Εικόνα 3.14 Τα hPSC-sSMC εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό συγκριτικά με τα hPSC-cSMC. Α. Ο ίδιος αριθμός των hESC-cSMC, hiPSC-cSMC και των hESC-sSMC, hiPSC-sSMC επιστρώθηκαν σε φρεάτια επικαλυμμένα με ζελατίνη και καλλιεργήθηκαν σε CDM και SDM αντίστοιχα. Αφού προσκολλήθηκαν, είτε μετρήθηκαν ($t=0$), είτε καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο (DMEM εμπλουτισμένο με 2% FBS). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έπειτα από 24 και 48h. Στα γραφήματα παρουσιάζεται η διαφορική αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων έπειτα από 24 και 48h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων

πειραμάτων. $*P<0,05$. $**P<0,01$. **B.** Τα hESC-cSMC και τα hESC-sSMC καλλιεργήθηκαν σε CDM και SDM είτε σε DMEM εμπλουτισμένο με 2% FBS για 24 και 48h. Συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχύλισματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών α SMA, Calponin και SM22 α , προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα του φαινοτύπου. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

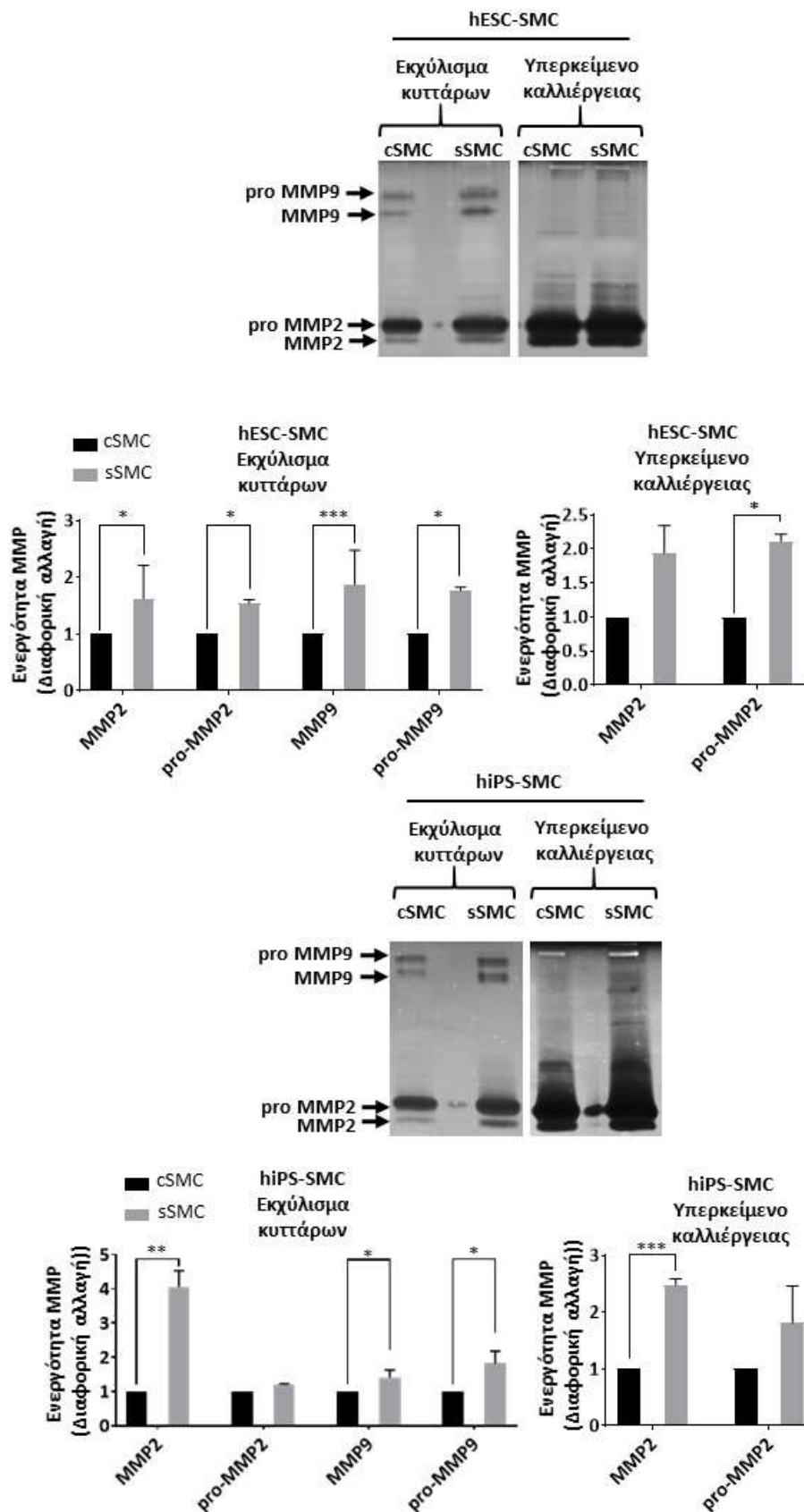


Εικόνα 3.15 Τα hPSC-sSMC εμφανίζουν αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα συγκριτικά με τα hPSC-cSMC. Σε μονοστιβάδες των hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC και των hESC-cSMC, hESC-sSMC προκλήθηκε "τραύμα" και ακολούθησε τακτική λήψη φωτογραφιών των κυττάρων για έως και 8h. Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο σχετικός αριθμός των κυττάρων που μετανάστευσαν έπειτα από 5 και 8h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. $*P<0,05$, $**P<0,01$.

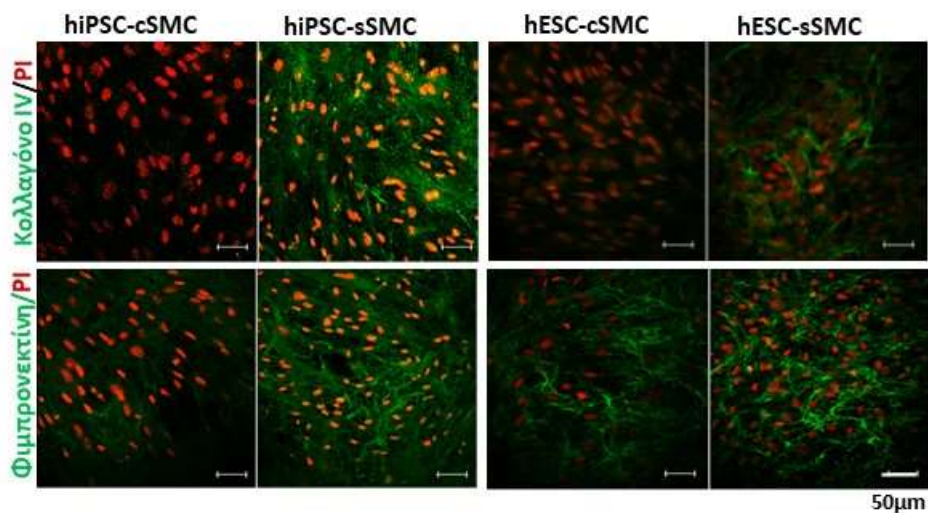
3.4.2 Τα hPSC-cSMC χαρακτηρίζονται από μειωμένη εναπόθεση συστατικών της ECM και ενεργότητα MMP σε σχέση με τα hPSC-sSMC

Συνεχίζοντας τον έλεγχο διαφόρων λειτουργιών των διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρήθηκε ότι τα hPSC-sSMC εμφάνιζαν αυξημένη ενεργότητα της MMP-2 τόσο στο υπερκείμενο καλλιέργειας όσο και στο κυτταρικό εκχύλισμα και της MMP-9 στο κυτταρικό εκχύλισμα των hPSC-sSMC σε σύγκριση με τα hPSC-cSMC (Εικόνα 3.16). Επιπλέον, σημειώθηκε αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM, όπως η φιβρονεκτίνη και το κολλαγόνο IV (Εικόνα 3.17), σε σύγκριση με τα hPSC-cSMC. Όλα

αυτά τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω (Ενότητες 3.4.1 και 3.4.2) είναι σε συμφωνία με τους φαινότυπους των πρωτογενών sSMC και cSMC [35],[39].



Εικόνα 3.16 Τα hPSC-sSMC εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα MMPs συγκριτικά με τα hPSC-cSMC. Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC (επάνω) και τα hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC (κάτω) καλλιεργήθηκαν σε κοινό θρεπτικό μέσο (DMEM) για 72h. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών καθώς και τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και μέσω πειραμάτων ζυμογραφίας αξιολογήθηκε σε αυτά η ενεργότητα των MMP2 και MMP9. Οι εικόνες είναι φωτογραφίες των πηκτωμάτων και είναι αντιπροσωπευτικές από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Στα γραφήματα παρουσιάζεται η ενεργότητα των MMPs στα hPSC-sSMC σε σχέση με τα hPSC-cSMC, όπως αξιολογήθηκε μέσω ποσοτικοποίησης της έντασης των αντίστοιχων μπαντών. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

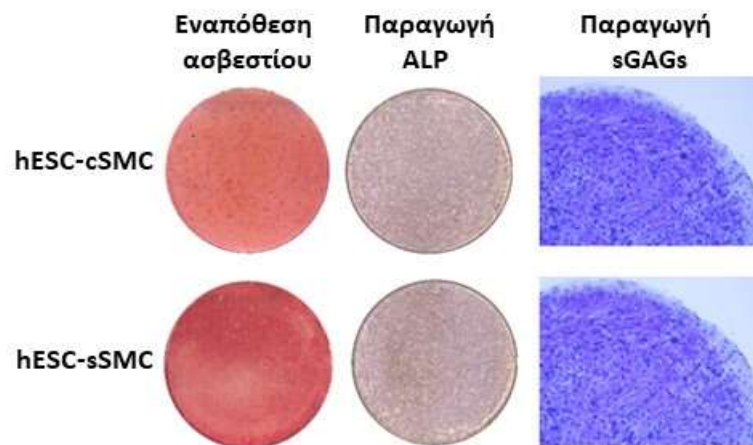


Εικόνα 3.17 Τα hPSC-sSMC εμφανίζουν αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM συγκριτικά με τα hPSC-cSMC. Τα hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC και τα hESC-cSMC, hESC-sSMC καλλιεργήθηκαν επάνω σε καλυπτρίδες κατάλληλες για μικροσκοπία. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο IV και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα κύτταρα που εκφράζαν τις πρωτεΐνες αυτές, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει τους πυρήνες (χρώση με PI). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.4.3 Τα hPSC-cSMC και hPSC-sSMC εμφανίζουν χαρακτηριστικά ολιγοδυναμίας

Θελήσαμε, επίσης, να διερευνήσουμε τη δυνατότητα ολιγοδυναμίας από τα δημιουργηθέντα κύτταρα, μια ιδιότητα που ενώ είναι χαρακτηριστική των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων έχει περιγραφεί και στα MC [48],[243],[244]. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε τα hESC-cSMC και τα hESC-sSMC ως προς την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα. Πράγματι όταν

αμφότεροι οι υπότυποι των κυττάρων βρέθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας εκδήλωσαν οστεογενετική και χονδρογενετική ικανότητα (Εικόνα 3.18).



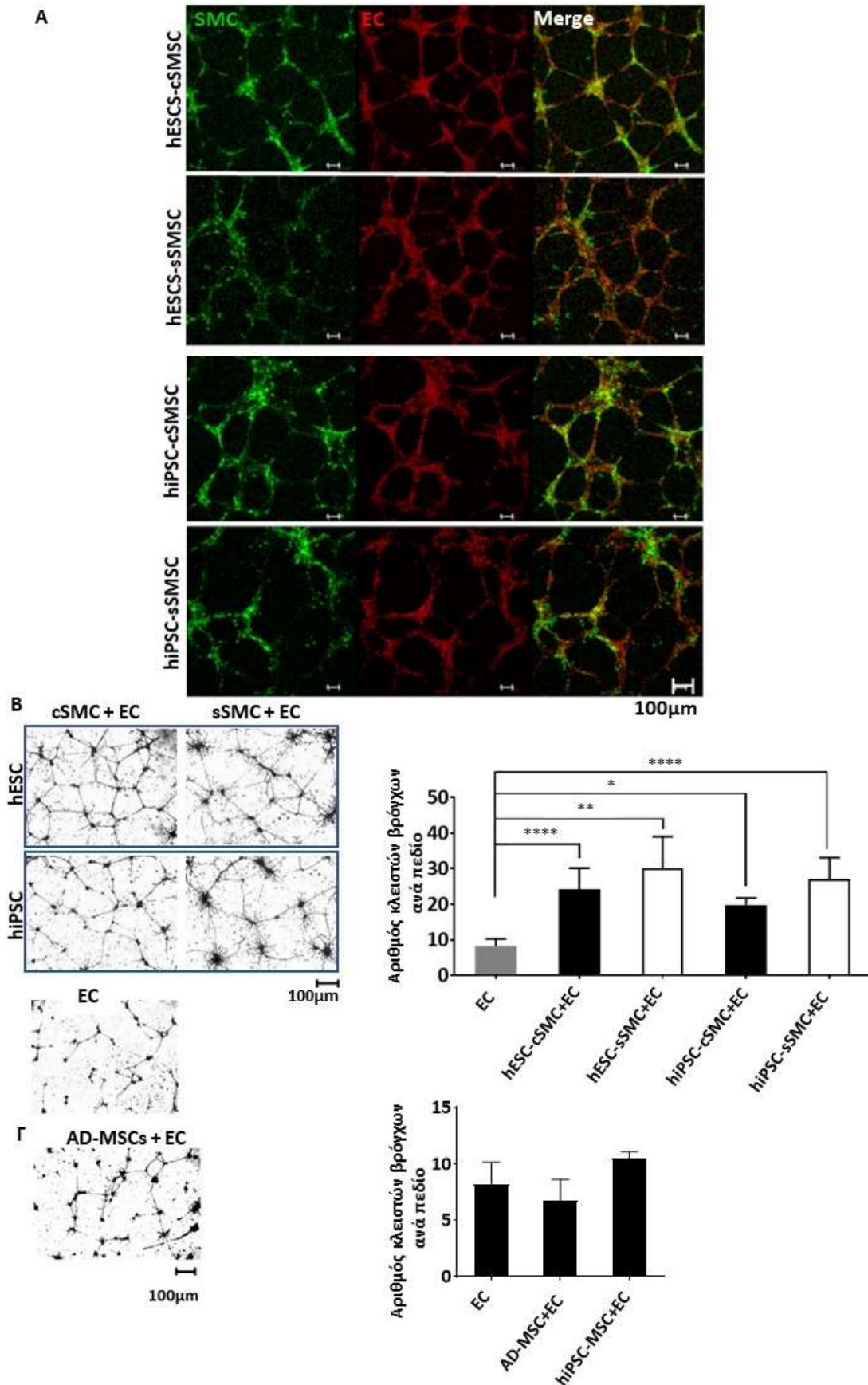
Εικόνα 3.18 Διαφοροποίηση των hESC-cSMC και των hESC-sSMC προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα. Πραγματοποιήθηκε επαγωγή της διαφοροποίησης των hESC-cSMC και των hESC-sSMC προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα μέσω τις καλλιέργειάς τους σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα (Ενότητα 2.5.5). Η επιτυχής διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα επιβεβαιώθηκε από την υψηλή εναπόθεση ασβεστίου, όπως φάνηκε έπειτα από χρώση με Alizarin Red (εικόνες αριστερά) και την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) (μεσαίες εικόνες), 21 ημέρες μετά την έναρξη της διαφοροποίησης. Η επιτυχής διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα επιβεβαιώθηκε από την υψηλή παραγωγή γλυκοζαμινογλυκανών (sGAGs) σε 3D καλλιέργεια, όπως φάνηκε έπειτα από χρώση με Alcian blue, 15 μετά την έναρξη της διαφοροποίησης (εικόνες δεξιά).

3.5 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC λειτουργούν ως MC *in vitro*

3.5.1 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC συμμετέχουν και σταθεροποιούν το ενδοθηλιακό δίκτυο σε μία *in vitro* δοκιμασία αγγειογένεσης

Τα MC εξ ορισμού είναι κύτταρα που εντοπίζονται στο τοίχωμα των αγγείων, σε στενή επαφή με τα EC και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και σταθερότητα του αγγείου [245],[26],[28],[24],[27]. Για να διερευνήσουμε την ικανότητα των παραγόμενων SMC να συμμετέχουν στον σχηματισμό του αγγειακού δικτύου αλλά και στη σταθεροποίησή του, αμφότεροι οι υπότυποι των κυττάρων συγκαλλιεργήθηκαν με πρωτογενή ανθρώπινα EC σε μία υδρογέλη matrigel (δοκιμασία *in vitro* αγγειογένεσης). Χρησιμοποιήθηκε μία σταθερή αναλογία 9:1 EC:SMC (hPSC-cSMC ή hPSC-sSMC), παρόμοια με τη μέση αναλογία που βρίσκεται στα επιμέρους αγγειακά δίκτυα του οργανισμού (vascular beds) [245]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19

αμφότερα τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC ενσωματώθηκαν στο δίκτυο που σχημάτισαν τα EC. Μάλιστα, η ποσοτικοποίηση των μορφομετρικών παραμέτρων των



Εικόνα 3.19 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC λειτουργούν ως τοιχωματικά κύτταρα in vitro.

A. Τα hPSC-cSMC και hPSC-sSMC συμμετέχουν στο δίκτυο των EC. Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC, hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC σημάνθηκαν με την πράσινη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH67, αναμείχθηκαν με μία αναλογία 1:9 με πρωτογενή EC, τα οποία είχαν σημανθεί με την κόκκινη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH26 και μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη matrigel, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δικτύου (δοκιμασία in vitro αγγειογένεσης). Στις εικόνες παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των κυττάρων, που λήφθηκαν με το Leica TCS SP5 συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από 8h και είναι αντιπροσωπευτικές 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. **B, Γ.** Τα hPSC-cSMC+EC και τα hPSC-sSMC+EC αναστέλλουν την υποστρόφι του δικτύου των EC in vitro. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το δίκτυο που σχημάτισαν τα hESC-cSMC+EC, hESC-sSMC+EC, hiPSC-cSMC+EC, hiPSC-sSMC+EC, EC και τα AD-MSC+EC (**Γ**) έπειτα από 48h. Ο αριθμός των κλειστών βρόγχων, που αντιπροσωπεύουν την ακεραιότητα του δικτύου, παρουσιάζονται στο διάγραμμα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

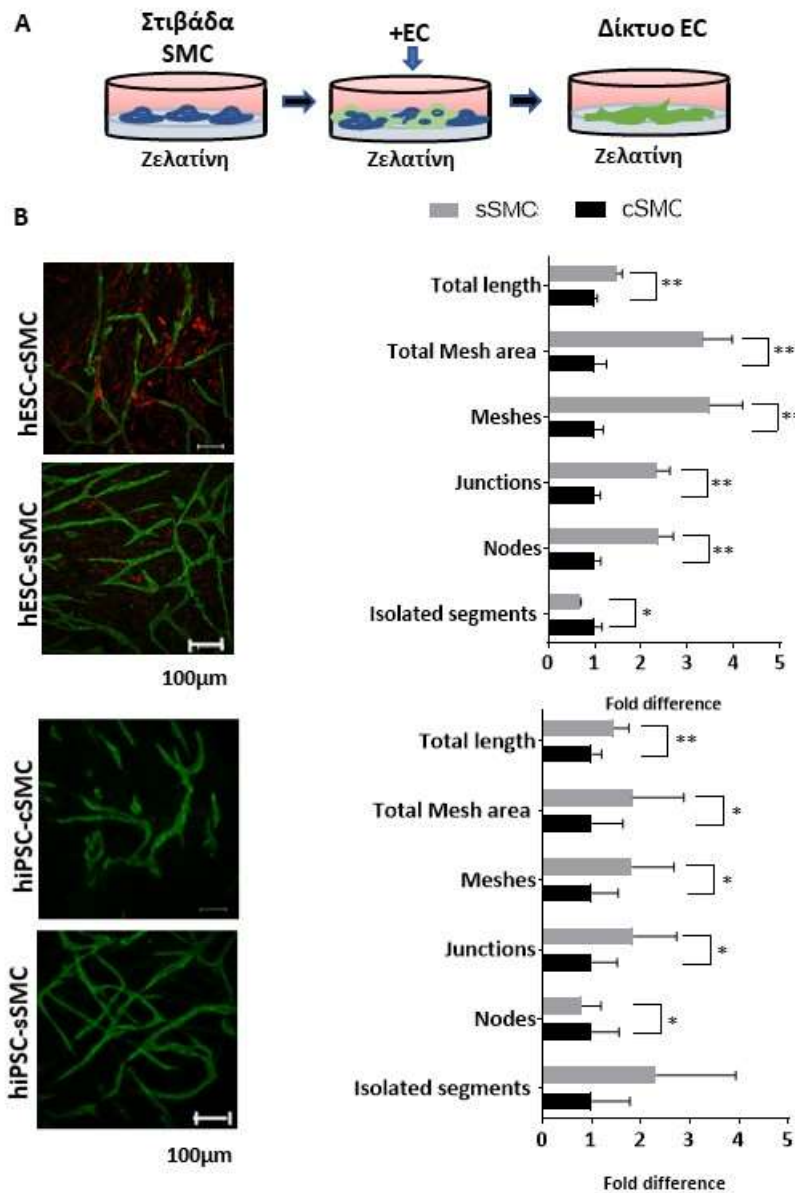
Πίνακας 3.1 Ανάλυση μορφομετρικών παραμέτρων του δικτύου που αναπτύσσεται από hPSC-cSMC+ EC, hPSC-sSMC+EC και EC σε υδρογέλη matrigel.

Μορφομετρικοί παράμετροι (Σχετικοί αριθμοί)	EC	hESC-cSMC+ EC	hESC-sSMC+ EC	EC	hiPSC-cSMC+ EC	hiPSC-sSMC+ EC
nodes	1.00±0.05	0.89±0.12	1.03±0.23	1.00±0.05	0,83±0,100	0,90±0,19
Junctions	1.00±0.06	0.90±0.11	1.00±0.22	1.00±0.04	0,76±0,09	0,90±0,19
meshes	1.00±0.10	0.82±0.12	1.02±0.33	1.00±0.12	0,83±0,31	1,00±0,34
total meshes area	1.00±0.20	0.84±0.24	1.01±0.12	1.00±0.30	1,19±0,38	1,65±0,37
isolated segments	1.00±0.65	1.30±0.33	0.73±0.32	1.00±0.18	0,75±0,29	0,89±0,57
total length	1.00±0.03	0.95±0.09	0.98±0.09	1.00±0.01	0,78±0,01	0,95±0,06

σχηματιζόμενων αγγειακών δομών (Ενότητα 2.5.7), δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δομών που σχημάτισαν τα hESC-cSMC+EC, τα hESC-sSMC+EC ή τα EC απουσία SMC (Πίνακας 3.1). Επιπλέον και οι δύο τύποι των SMC σταθεροποίησαν το σχηματιζόμενο αγγειακό δίκτυο και ανέστειλαν την υποστρόφη του, που αναμενόμενα λάμβανει χώρα όταν το δίκτυο αποτελείται μόνο από EC (Εικόνα 3.19B). Αντίθετα, τα MSC που προέρχονται από λιπώδη ιστό (AD-MSC) ή τα hiPSC-MSC [233] όταν χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια πειραματική δοκιμασία απέτυχαν να αναστείλουν την υποστρόφη του δικτύου των EC (Εικόνα 3.19Γ). Φαίνεται λοιπόν ότι τα hPSC-cSMC και hPSC-sSMC, αν και παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά των MSC, λειτουργούν κατά βάση ως MC.

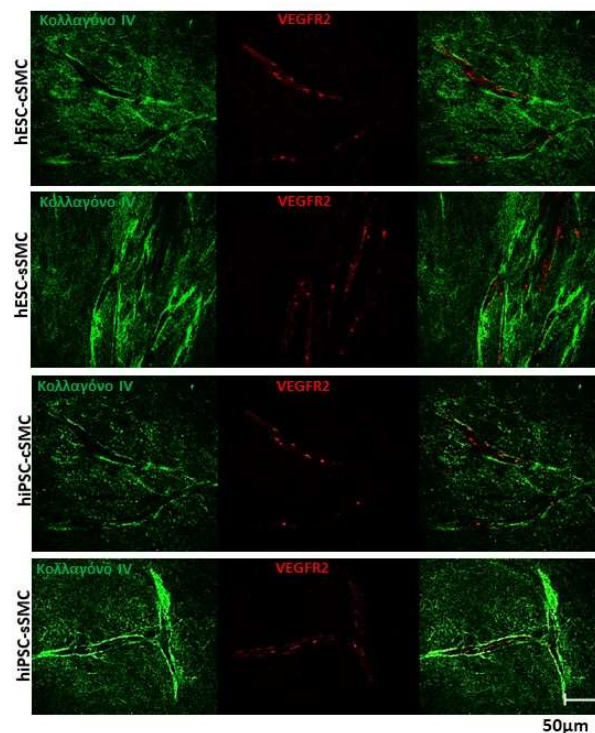
3.5.2 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC επάγουν την οργάνωση των EC σε δίκτυο όταν συγκαλλιεργούνται σε 2D

Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC καλλιεργήθηκαν μαζί με τα EC με στόχο να διαπιστώσουμε την ικανότητα τους να επάγουν την οργάνωση των δευτέρων σε δίκτυο. Όπως φαίνεται στη εικόνα 3.20 όταν τα EC προστέθηκαν πάνω σε μια μονοστιβάδα των hPSC-sSMC, οργανώθηκαν σε ένα σημαντικά πιο πολύπλοκο δίκτυο, όπως αυτό εκτιμήθηκε από την ανάλυση διάφορων μορφομετρικών παραμέτρων (Ενότητα 2.5.7), σε σύγκριση με εκείνο που αναπτύχθηκε από τα EC που προστέθηκαν σε μία μονοστιβάδα των hPSC-cSMC. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η εναπόθεση κολλαγόνου IV, που αποτελεί συστατικό της βασικής μεμβράνης των αγγείων. Κατά την συγκαλλιέργεια των hESC-sSMC+EC παρατηρήθηκε μία πιο σαφής και συνεχόμενη χρώση κολλαγόνου IV, που οριοθετούσε το δημιουργούμενο δίκτυο των EC σε σύγκριση



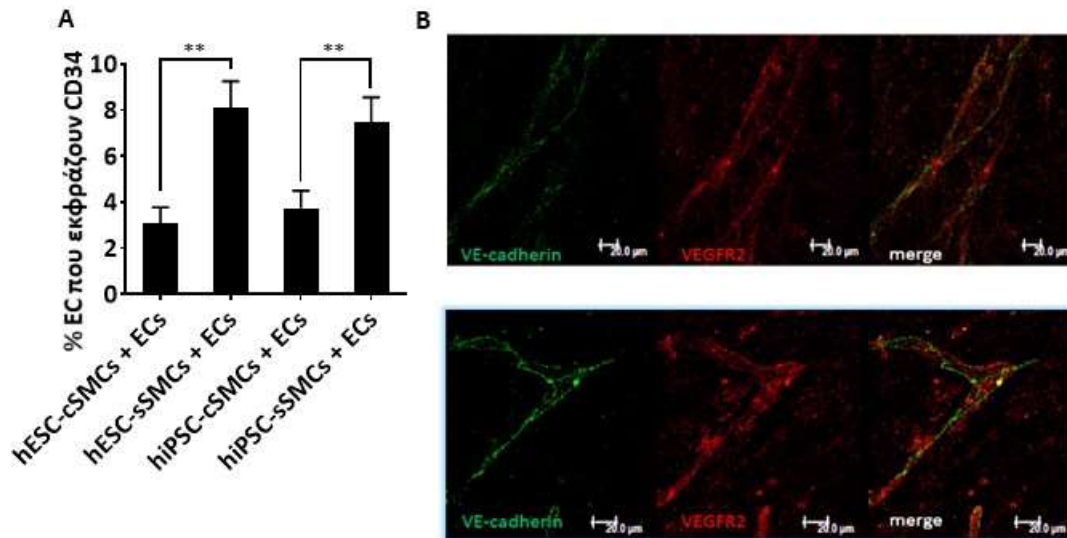
Εικόνα 3.20 Τα hPSC-sSMC και τα hPSC-cSMC επάγουν σε διαφορετικό βαθμό την οργάνωση των EC σε δίκτυο. **A.** Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου. **B.** Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC (επάνω) και τα hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC (κάτω) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi, κατάλληλα για μικροσκοπία. Πάνω στις μονοστιβάδες αυτών προστέθηκαν EC. Έπειτα από 4 ημέρες συγκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες CD31, SM22α και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα EC που εκφράζαν το δείκτη CD31, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει τα hPSC-SMC που εκφράζαν την πρωτεΐνη SM22α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. Μορφομετρική ανάλυση και σύγκριση του σχηματιζόμενου δικτύου των EC κατά τη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC, hESC-sSMC+EC και των hiPSC-cSMC+EC, hiPSC-sSMC+EC παρουσιάζεται στα γραφήματα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ και αφορούσε 6 παραμετρους. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

με τη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC (Εικόνα 3.21). Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την επίδραση της συγκαλλιέργειας των δύο διαφορετικών φαινότυπων των SMC στα EC του σχηματισθέντος δικτύου, μελετήσαμε την έκφραση του CD34, δείκτη ενεργοποίησης των EC που χαρακτηρίζει τα κύτταρα κορυφής [16], καθώς και την έκφραση της VE-cadherin, δείκτη στεγανότητας του ενδοθηλιακού δικτύου που εντοπίζεται στις συνδέσεις μεταξύ των EC. Διαπιστώθηκε πως περισσότερα CD34+ κύτταρα εντοπίστηκαν στη συγκαλλιέργεια των hESC-sSMC+EC συγκριτικά με τη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC, υποδεικνύοντας περισσότερα κύτταρα κορυφής και επομένως υψηλότερο αγγειογενετικό δυναμικό (Εικόνα 3.22A), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί διαφορά στον συνολικό αριθμό των EC, που θα μπορούσε να ευθύνεται για τα αποτελέσματα αυτά. Αντιθέτως, η έκφραση της VE-cadherin ήταν υψηλότερη στη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια των hESC-sSMC+EC (Εικόνα 3.22B), υποδηλώνοντας ένα πιο στεγανό δίκτυο στη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC.



Εικόνα 3.21 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC κατά τη συγκαλλιέργεια με τα EC εναποθέτουν κολλαγόνο iv. Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC (επάνω) και τα hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC (κάτω) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi, κατάλληλα για μικροσκοπία. Πάνω στις μονοστιβάδες αυτών προστέθηκαν EC. Έπειτα από 4 ημέρες συγκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες κολλαγόνο iv, VEGFR2 και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει την έκφραση του κολλαγόνου IV, ενώ με κόκκινο φαίνονται τα EC (χρώση έναντι του VEGFR2).

Οι εικόνες λήφθηκαν με το Leica TCS SP5 συνεστιακό μικροσκόπιο και είναι αντιπροσωπευτικές από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

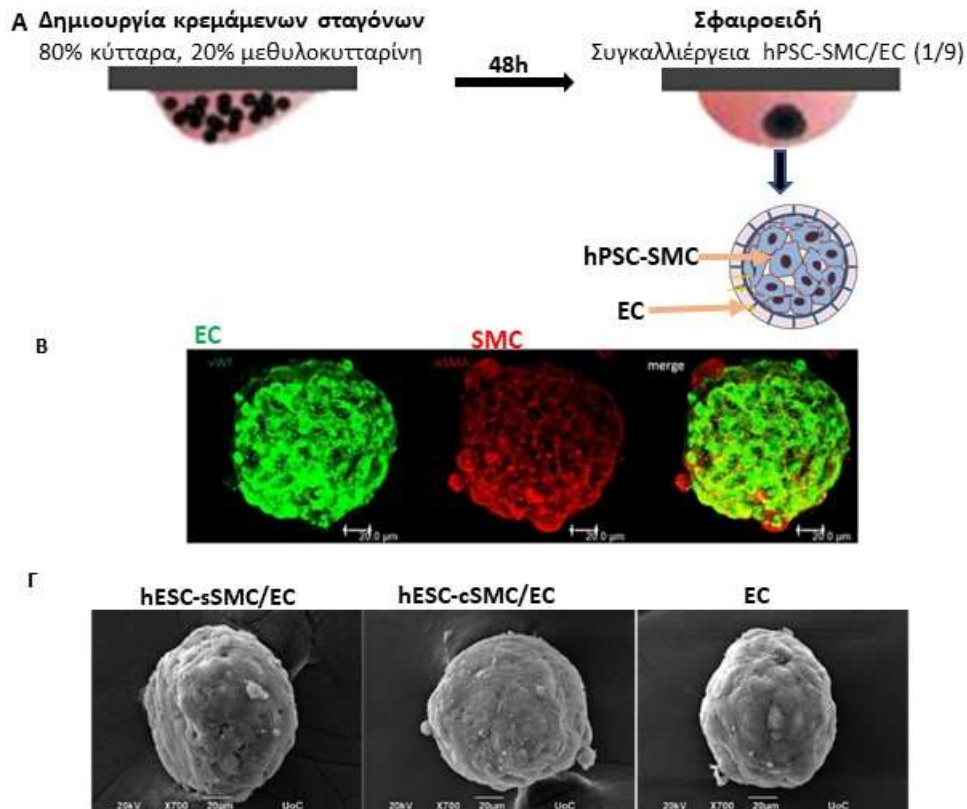


Εικόνα 3.22 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC επηρεάζουν διαφορετικά το φαινότυπο των EC κατά τη συγκαλλιέργειά τους. Α. Η έκφραση του CD34. Στις μονοστιβάδες των hESC-cSMC, hESC-sSMC και των hiPSC-cSMC, hiPSC-sSMC προστέθηκαν EC και συγκαλλιεργήθηκαν. Έπειτα από 4 ημέρες αναλύθηκε σε αυτά η έκφραση του δείκτη CD34 και του CD31, μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής. Το ποσοστό των EC που εκφράζουν τον δείκτη CD34 ως προς το σύνολο των EC (έκφραση CD31) κατά τη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC, hESC-sSMC+EC, hiPSC-cSMC+EC και των hiPSC-sSMC+EC παρουσιάζεται στο γράφημα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P<0,01$. **Β.** Η έκφραση της ve-cadherin. Έπειτα από τη συγκαλλιέργεια των hESC-cSMC+EC και των hESC-sSMC+EC σε φρεάτια *ibidi*, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες ve-cadherin, VEGFR2 και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει την έκφραση της ve-cadherin, ενώ με κόκκινο φαίνονται η έκφραση του VEGFR2.

3.6 Δημιουργία 3D δομών (αγγειακών οργανοειδών) αποτελούμενων από hPSC-SMC και EC

Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η δράση των hPSC-SMC ως MC και να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του φαινότυπου των δύο υπότυπων hPSC-SMC, απαραίτητες προϋποθέσεις, δηλαδή, για την εφαρμογή τους στον τομέα της MI [218],[219], δημιουργήσαμε ένα μοντέλο 3D συγκαλλιέργειας των hPSC-SMC/EC με τη μορφή σφαιροειδούς, που μιμείται το περιβάλλον του ιστού στον οργανισμό. Αρχικά, αναλύθηκε η αυτο-οργάνωση 1.000 κυττάρων hPSC-SMC:EC σε ένα αγγειακό οργανοειδές, όταν αυτά συγκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο EGM-2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων. Τα κύτταρα στις συγκαλλιέργειες των SMC (hPSC-cSMC ή hPSC-sSMC):EC, με αναλογία κυττάρων 1:9,

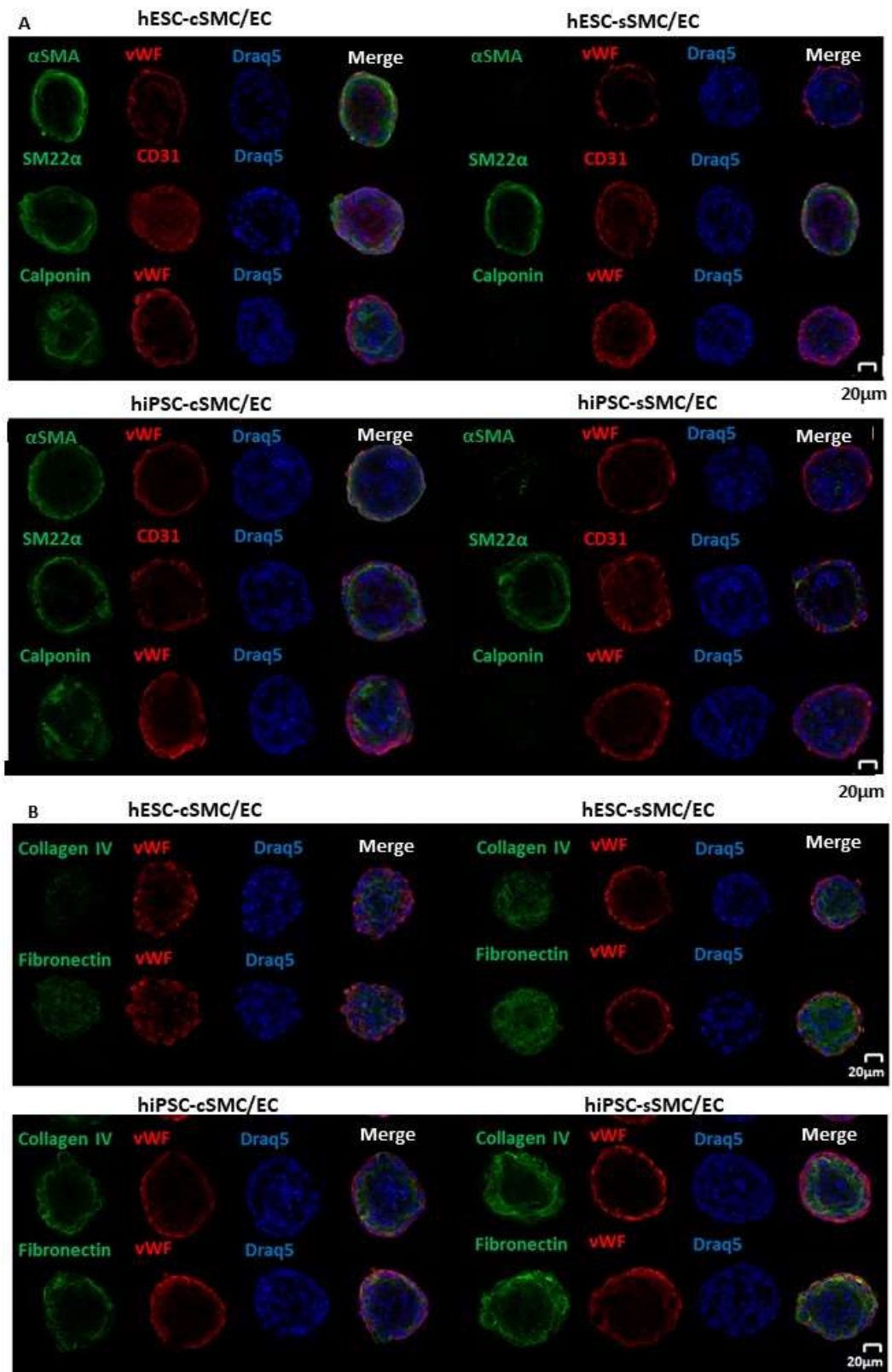
συσσωματώθηκαν γρήγορα, σχηματίζοντας 3D αγγειακά οργανοειδή εντός 48h (Εικόνα 3.23), τα οποία χαρακτηριζόταν από επιφανειακή κατανομή των EC και εσωτερική (κάτω από τα EC) εντόπιση των hPSC-SMC (Εικόνα 3.23B). Επίσης, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης διαπιστώσαμε ότι η επιφάνεια όλων των διαφορετικών 3D δομών, είχε παρόμοια μορφολογία και τα κύτταρα έδειχναν να είναι το ίδιο στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους (Εικόνα 3.23Γ).



Εικόνα 3.23 Δημιουργία σφαιροειδών/αγγειακών οργανοειδών. Α. Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου. **Β.** Αντιπροσωπευτική εικόνα από ένα αγγειακό οργανοειδές που αποτελείται συνολικά από 1.000 hESC-cSMC/EC, σε αναλογία 1/9. Τα hESC-cSMC σημάνθηκαν με την κόκκινη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH26, ενώ τα EC με την πράσινη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH57. Έπειτα από 2 ημέρες συγκαλλιέργειας στη δομή αυτή, μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. **Γ.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hESC-cSMC/EC ή hESC-sSMC/EC και σφαιροειδή των EC, τα οποία αναλύθηκαν μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης.

3.6.1 Τα hPSC-cSMC/sSMC διατηρούν σταθερό τον φαινότυπό τους όταν είναι οργανωμένα με τα EC σε αγγειακά οργανοειδή

Ανάλυση του φαινότυπου των κυττάρων στα αγγειακά οργανοειδή μέσω ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι τα hPSC-cSMC εξακολουθούσαν να εκφράζουν τις

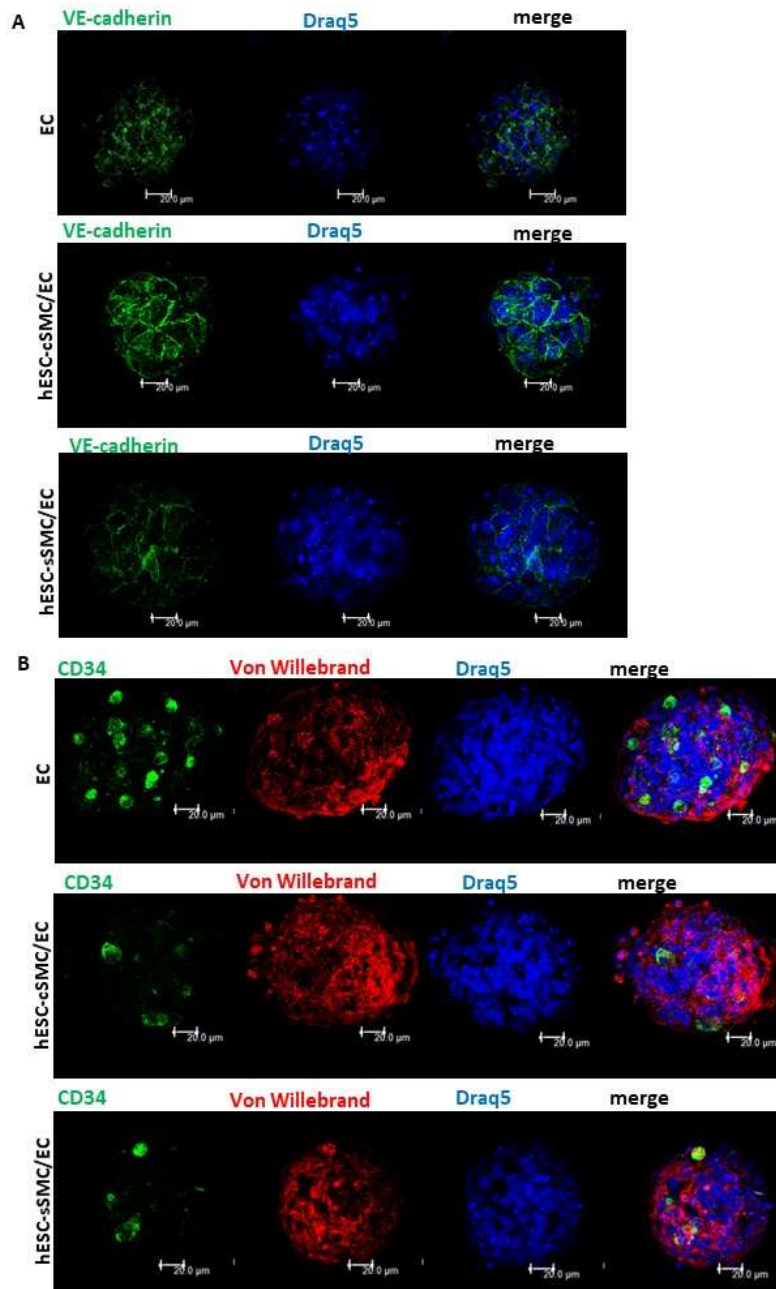


Εικόνα 3.24 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αγγειακών οργανοειδών. Α. Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC διατηρούν το φαινότυπό τους όταν είναι οργανωμένα σε αγγειακά οργανοειδή. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνται από hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων, όπου και επώαστηκαν για 2 ημέρες. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων στη δομή αυτή, έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες *αSMA*, *SM22α*, *calponin*, *CD31* και *von-willebrand* και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα SMC που εκφράζαν τις πρωτεΐνες *αSMA*, *SM22α*, *calponin*, ο κόκκινος φθορισμός υποδεικνύει τα EC (έκφραση *CD31* ή *von-willebrand*), ενώ με μπλε φαίνονται οι πυρήνες (χρώση με *daq5*). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. **Β.** Στα hPSC-sSMC/EC αγγειακά οργανοειδή υπάρχει αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM, συγκριτικά με τα hPSC-cSMC/EC αγγειακά οργανοειδή. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνται από hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC μονιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες κολλαγόνο *iv*, φιβρονεκτίνη και *von-willebrand* και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει την έκφραση κολλαγόνου *iv* ή φιβρονεκτίνης, ο κόκκινος φθορισμός υποδεικνύει τα EC (έκφραση *von-willebrand*), ενώ με μπλε φαίνονται οι πυρήνες (χρώση με *daq5*). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

συσταλτικές πρωτεΐνες σε υψηλά επίπεδα, ενώ τα hPSC-sSMC σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (Εικόνα 3.24A), διατηρώντας, δηλαδή, τον ίδιο φαινότυπο με αυτόν που είχαν τα κύτταρα σε μία τυπική 2D καλλιέργεια. Στο ίδιο πλαίσιο, τα αγγειακά οργανοειδή των hPSC-sSMC:EC χαρακτηρίζονταν από αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM, σε σύγκριση με τα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hPSC-cSMC:EC (Εικόνα 3.24B).

3.6.2 Τα hESC-cSMC/sSMC επηρεάζουν τον φαινότυπο των EC στα αγγειακά οργανοειδή

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε τυχόν επίδραση των διαφορετικών υπότυπων των hPSC-SMC στο φαινότυπο των EC στα αγγειακά οργανοειδή. Μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, παρατηρήθηκε διαφορετική έντοπιση της VE-cadherin στα EC. Συγκεκριμένα, η έκφρασή της ήταν μεγαλύτερη και η εντόπισή της στην επιφάνεια επαφής EC-EC ήταν εμφανής στα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hESC-cMC:EC, σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες (σφαιροειδή των EC, hESC-sMC/EC αγγειακά οργανοειδή) (Εικόνα 3.25A). Τέλος, στα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hESC-cSMC/sSMC:EC υπήρξε μία μείωση στον πληθυσμό των EC που εκφράζαν CD34, δείκτη ενεργοποίησης των EC, σε σχέση με τα σφαιροειδή που αποτελούνταν μόνο από EC (Εικόνα 3.25B).



Εικόνα 3.25 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των EC στα αγγειακά οργανοειδή/ σφαιροειδή.

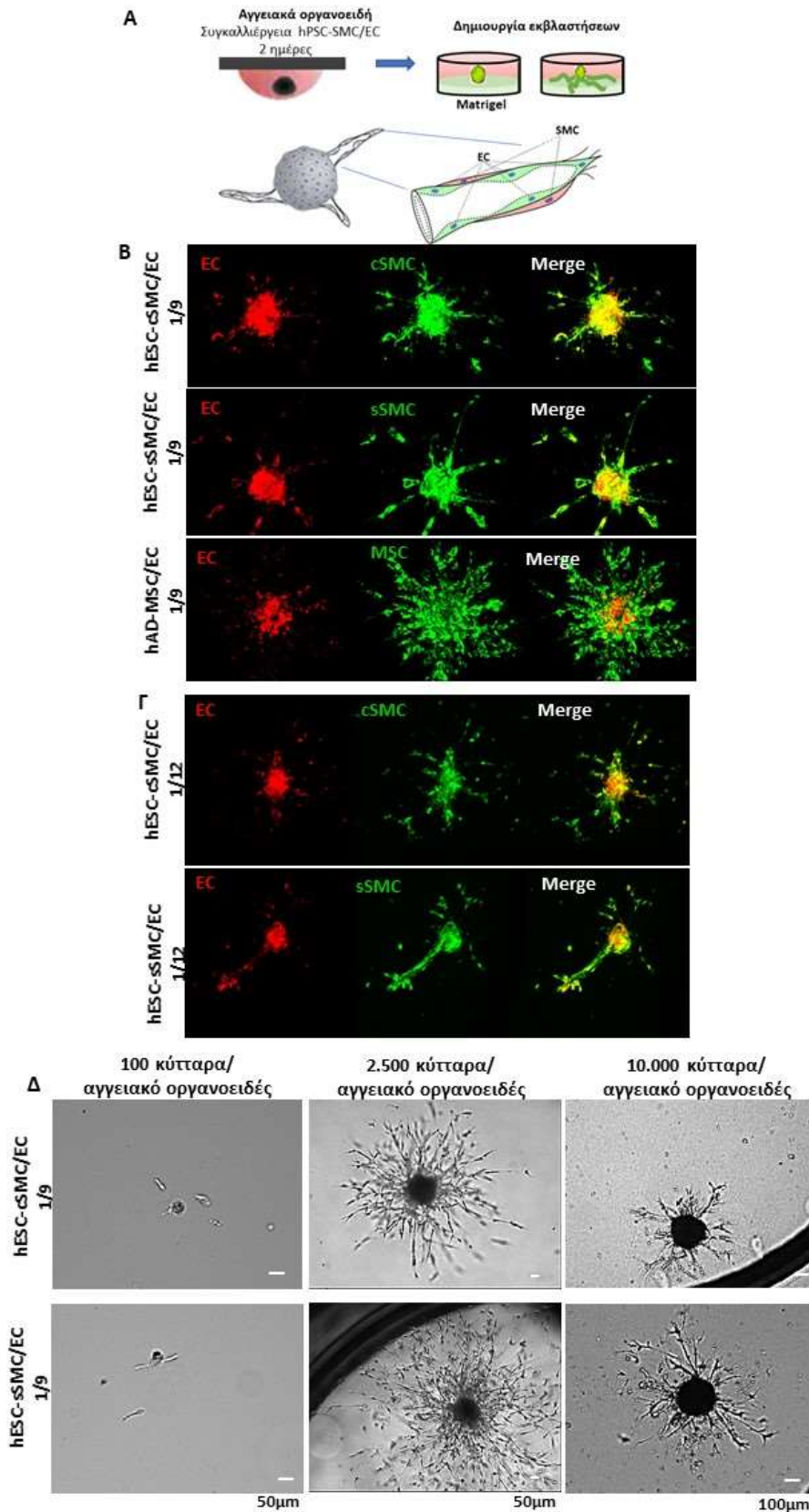
A. Η έκφραση της ve-cadherin. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hESC-cSMC/EC ή hESC-sSMC/EC και σφαιροειδή EC μονιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες CD34 και von-Willebrand και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει τα κύτταρα που εκφράζαν ve-cadherin, ενώ το μπλε δείχνει τους πυρήνες (χρώση με Draq5). Οι εικόνες λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 και είναι αντιπροσωπευτικές από 3 ανεξάρτητα πειράματα. **B.** Η έκφραση του CD34. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hESC-cSMC/EC ή hESC-sSMC/EC και σφαιροειδή EC μονιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες CD34 και von-Willebrand και ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει τα κύτταρα που εκφράζαν CD34, ο κόκκινος φθορισμός υποδηλώνει τα κύτταρα που εκφράζαν von-Willebrand, ενώ το μπλε

δείχνει τους πυρήνες (χρώση με Draq5). Οι εικόνες λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 και είναι αντιπροσωπευτικές από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.7 Λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών *in vitro*

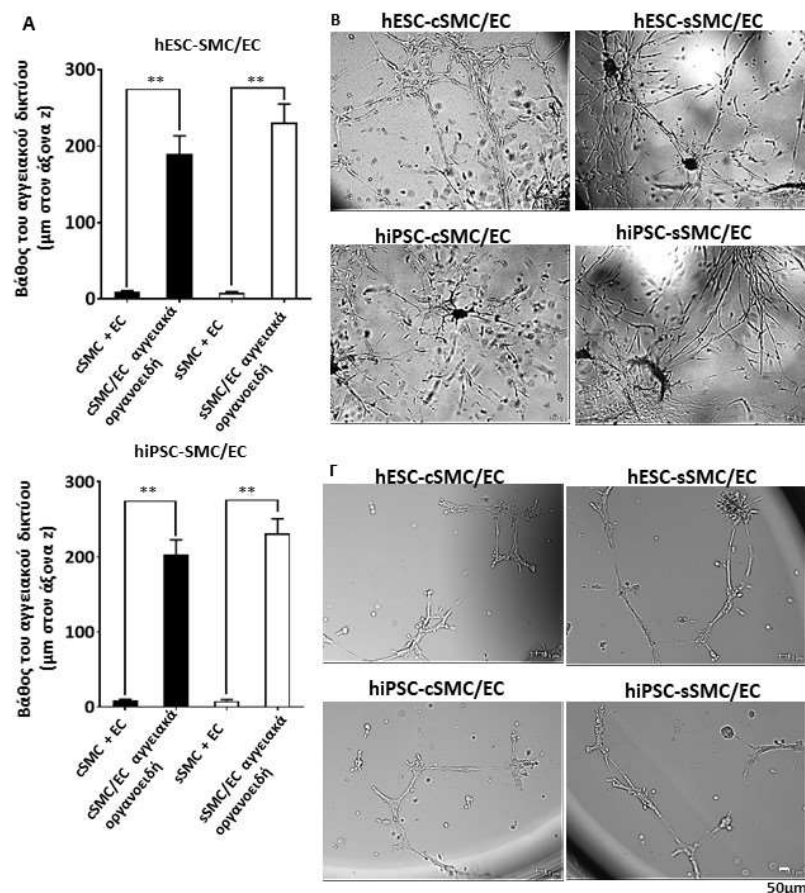
3.7.1 Τα αγγειακά οργανοειδή δημιουργούν σε υδρογέλες εκβλαστήσεις στις οποίες συμμετέχουν τόσο τα hPSC-cSMC/sSMC όσο και τα EC

Το αγγειογενετικό δυναμικό των hPSC-SMC:EC αγγειακών οργανοειδών μελετήθηκε σε μία *in vitro* δοκιμασία σχηματισμού εκβλαστήσεων σε matrigel. Όταν τα αγγειακά οργανοειδή τοποθετήθηκαν επάνω σε μία υδρογέλη matrigel δημιουργήθηκαν από αυτά οργανωμένες εκβλαστήσεις, προσομοιάζοντας ένα δίκτυο τριχοειδών (Εικόνα 3.26B). Είναι ενδιαφέρον ότι σε αντίθεση με τα σφαιροειδή που αποτελούνταν από AD-MSC/EC, στα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hPSC-SMC:EC και οι δύο τύποι των hESC-SMC καθώς και τα EC συνεντοπίζονταν στις εκβλαστήσεις (Εικόνα 3.26B). Το ίδιο αγγειογενετικό δυναμικό παρουσίαζαν, επίσης, αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν τόσο από διαφορετικό αριθμό κυττάρων (100, 2.500, 10.000 κύτταρα/οργανοειδές) με την ίδια αναλογία hPSC-SMC:EC, όσο και αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από 1.000 κύτταρα, αλλά με διαφορετική αναλογία hPSC-SMC:EC (1:12) (Εικόνα 3.26Γ). Τέλος, το δίκτυο που δημιουργήθηκε από τα αγγειακά οργανοειδή εκτείνονταν σε βάθος και παρέμενε σταθερό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με το δίκτυο που δημιουργούνταν από τον αντιστοιχο αριθμό και αναλογία μονήρη κυττάρων (Εικόνα 3.27).



Εικόνα 3.26 Δημιουργία εκβλαστήσεων από τα αγγειακά οργανοειδή σε υδρογέλη matrigel. A. Ζωγραφική απεικόνιση της μεθόδου. **B.** Αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από τους δύο τύπους hPSC-SMC/EC και σφαιροειδή αποτελούμενα από hAD-MSC/EC μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη matrigel με αποτέλεσμα τη δημιουργία εκβλαστήσεων.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες 3 ημέρες μετά την προσθήκη τους στο *matrigel*. Ο κόκκινος φθορισμός υποδηλώνει τα EC (σημασμένα με τη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH26), ενώ με πράσινο φαίνονται τα hESC-cSMC, hESC-sSMC και τα hiAD-MSC (σημασμένα με τη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH67). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 και είναι αντιπροσωπευτικές από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. Γ. Αγγειακά οργανοειδή 1.000 συνολικά κυττάρων, που αποτελούνται από hESC-cSMC/EC είτε από hESC-sSMC/EC με αναλογία 1/12, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων, όπου επώαστηκαν για 2 ημέρες, μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη *matrigel* και καλλιεργήθηκαν για άλλες 3 ημέρες. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5. Ο κόκκινος φθορισμός υποδηλώνει τα EC (σημασμένα με τη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH26), ενώ με πράσινο φαίνονται τα hESC-cSMC και τα hESC-sSMC σημασμένα με τη φθορίζουσα μεμβρανική χρωστική PKH67. Δ. Αγγειακά οργανοειδή με συνολικό αριθμό κυττάρων 100, 2.500 ή 10.000, που αποτελούνταν από hESC-cSMC/EC είτε από hESC-sSMC/EC με αναλογία 1/9 δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων, όπου επώαστηκαν για 2 ημέρες. Μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη *matrigel*, όπου καλλιεργήθηκαν για 3 ημέρες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία εκβλαστήσεων. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης και είναι αντιπροσωπευτικές από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

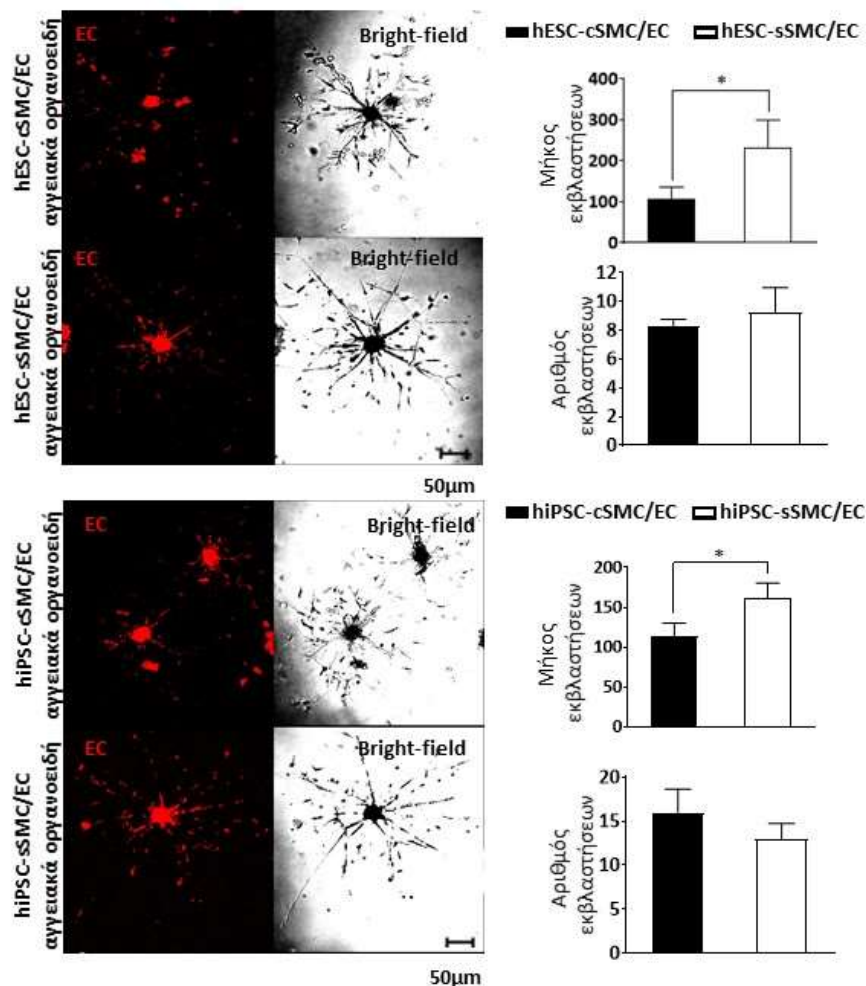


Εικόνα 3.27 Τα αγγειακά οργανοειδή δημιουργούν εκτενέστερο και μαγαλύτερης διάρκειας δίκτυο σε σχέση με τα μονήρη κύτταρα. Α. Τα hESC-cSMC+EC, hESC-sSMC+EC και τα hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC ως μονήρη κύτταρα είτε οργανωμένα ως αγγειακά οργανοειδή προστέθηκαν σε μία υδρογέλη *matrigel*. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν το βάθος που εκτείνεται το δίκτυο που σχηματίστηκε σε κάθε περίπτωση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3

ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P < 0,01$. **B, Γ.** Ίσος αριθμός των *hESC-cSMC+EC*, *hESC-sSMC+EC* και των *hiPSC-cSMC/EC*, *hiPSC-sSMC/EC* οργανωμένα ως αγγειακά οργανοειδή (**B**), είτε ως μονήρη κύτταρα (**Γ**) μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη *matrigel* με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δικτύου. Στις εικόνες παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των κυττάρων, που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης μετά από 10 (**B**) είτε μετά από 3 (**Γ**) ημέρες.

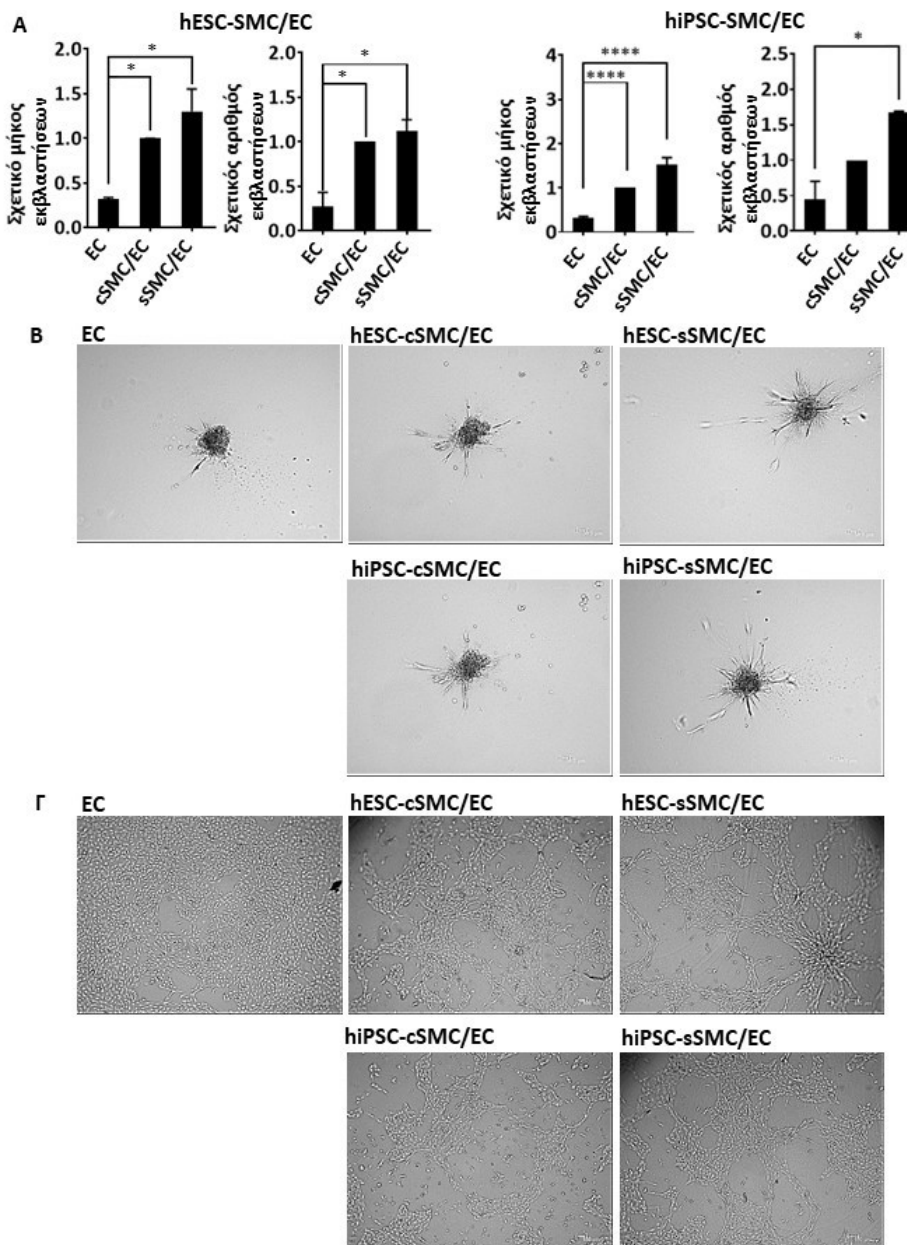
3.7.2 Τα *hPSC-sSMC:EC* αγγειακά οργανοειδή σχηματίζουν μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με τα *hPSC-cSMC:EC*

Τα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από *hPSC-sSMC:EC* σχημάτισαν σημαντικά μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σύγκριση με αυτές που σχημάτισαν εκείνα που αποτελούνταν από *hPSC-cSMC:EC* όταν εμφυτεύθηκαν σε υδρογέλη από *matrigel* (Εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.28 Τα αγγειακά οργανοειδή των *hPSC-sSMC:EC* σχηματίζουν μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με αυτά των *hPSC-cSMC:EC* σε υδρογέλη *matrigel*. Αγγειακά οργανοειδή 1.000 συνολικά κυττάρων, που αποτελούνται από *hESC-cSMC/EC*, *hESC-sSMC/EC* (επάνω) είτε *hiPSC-cSMC/EC*, *hiPSC-sSMC/EC* (κάτω) με αναλογία 1/9, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων και μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη *matrigel*. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο *Leica*

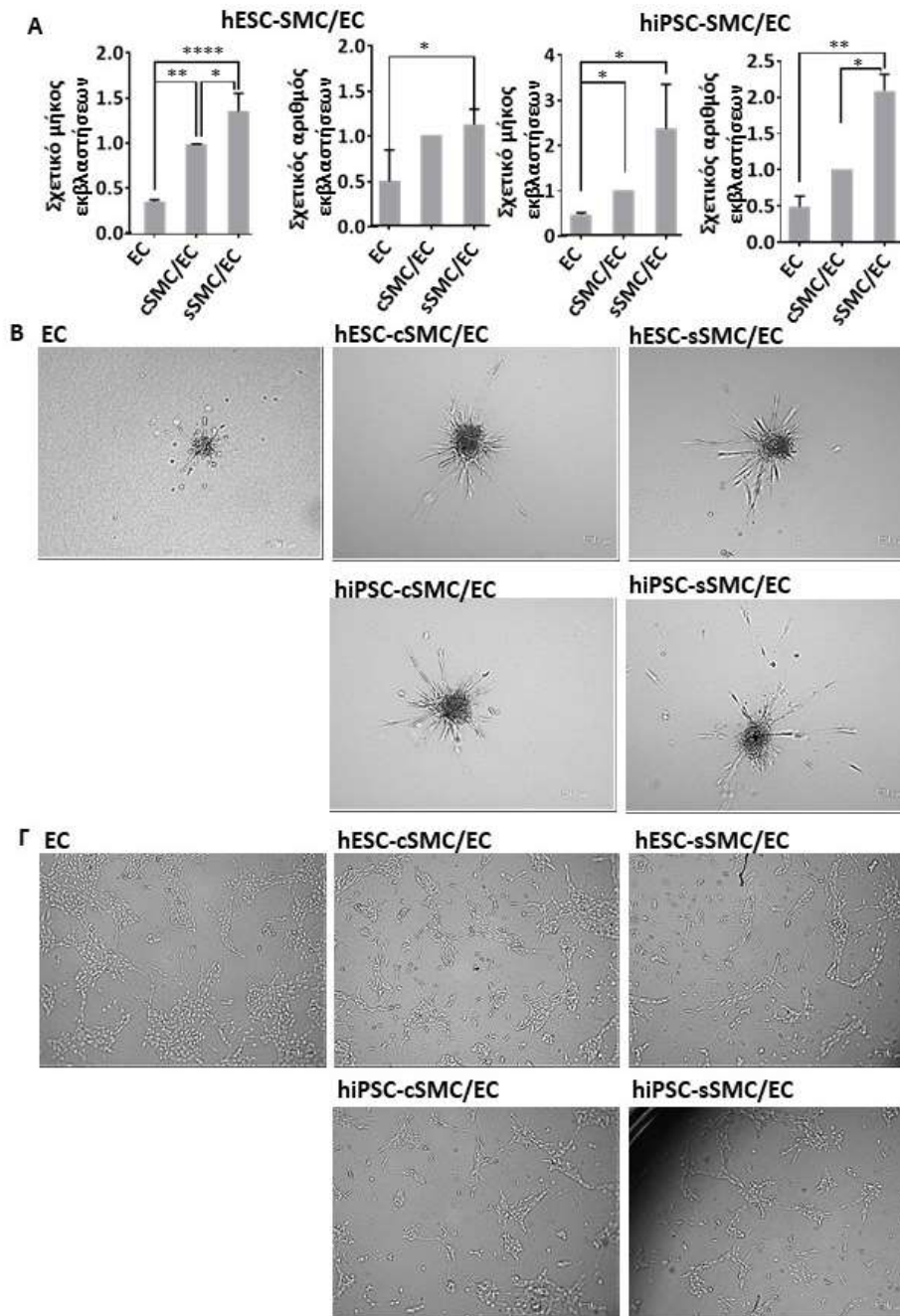
TCS SP5 έπειτα από 3 ημέρες. Με κόκκινο φαίνονται τα EC (σημασμένα με τη μεμβρανική χρωστική PKH26, αριστερή στήλη). Τα διαγράμματα παρουσιάζουν το μήκος και τον αριθμό των εκβλαστήσεων που σχηματίστηκαν ανά σφαιροειδές. Ο αριθμός και το μήκος των εκβλαστήσεων ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό *imageJ*. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$.



Εικόνα 3.29 Τα *hPSC-cSMC:EC*, *hPSC-sSMC:EC* αγγειακά οργανοειδή σχηματίζουν περισσότερες και μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με τα σφαιροειδή των *EC* σε υδρογέλη κολλαγόνου. **A**. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνται από *hESC-cSMC/hESC-EC*, *hESC-sSMC/hESC-EC* ή *hiPSC-cSMC/EC*, *hiPSC-sSMC/EC* με αναλογία 1/9, και σφαιροειδή των *EC*, 1.000 συνολικά κυττάρων, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων και μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη κολλαγόνου. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν το σχετικό μήκος και τον σχετικό αριθμό των εκβλαστήσεων που σχημάτισαν οι δομές αυτές έπειτα από 24h. Ο αριθμός και το μήκος των εκβλαστήσεων ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το

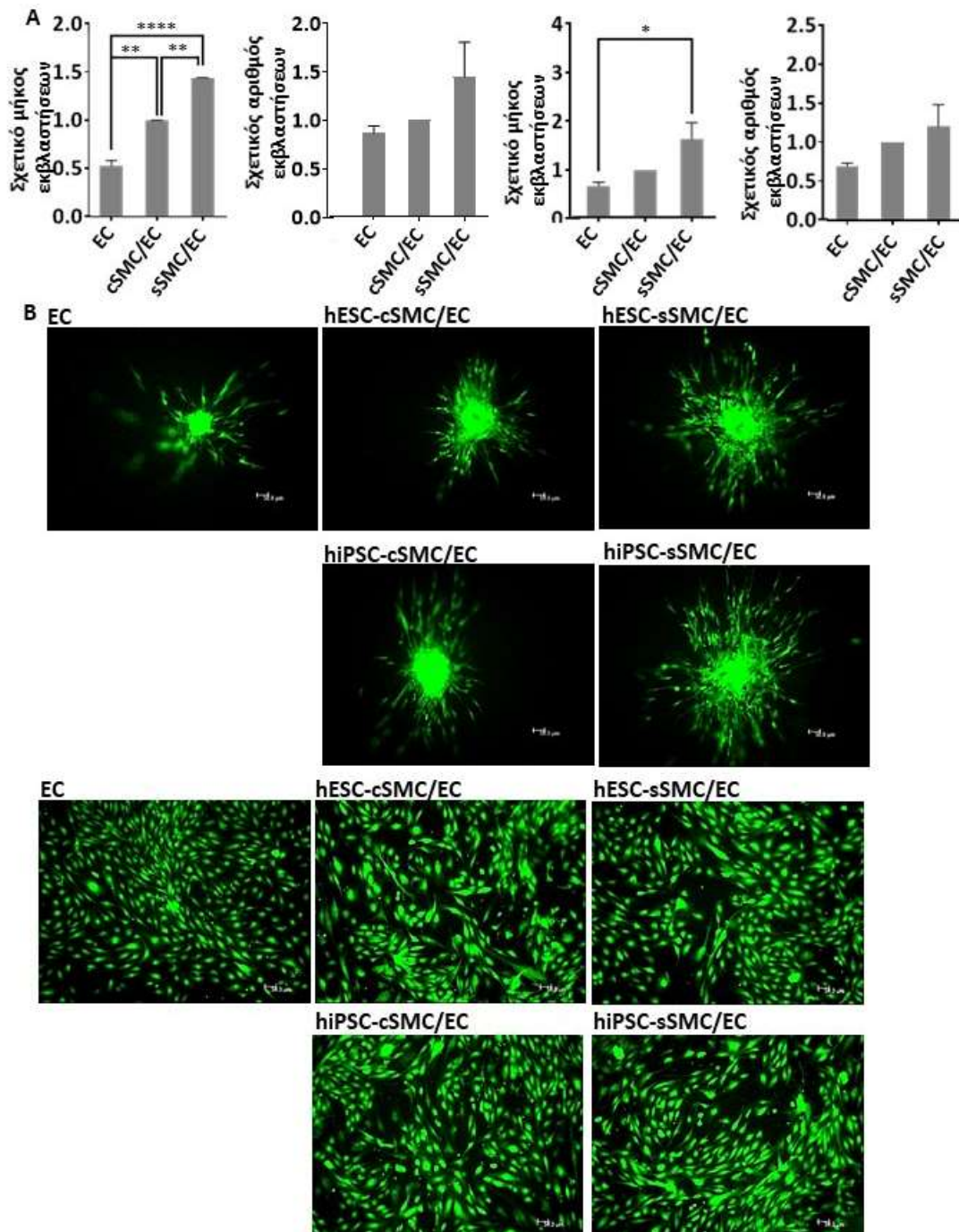
λογισμικό *imageJ*. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. **B.** Οι εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών 24h μετά την μεταφορά τους σε υδρογέλη κολλαγόνου, οι οποίες λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης. **Γ.** Τα hPSC-SMC+EC ή τα EC ως μονήρη κύτταρα δε δημιουργούν δίκτυο σε υδρογέλη κολλαγόνου. Τα hESC-cSMC/EC, hESC-sSMC/EC, hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC με αναλογία 1/9 και τα EC ως μονήρη κύτταρα μεταφέρθηκαν σε υδρογέλη κολλαγόνου. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης, 24h μετά την προσθήκη τους στην υδρογέλη κολλαγόνου.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω το αγγειογενετικό δυναμικό των hPSC-SMC:EC αγγειακών οργανοειδών σε ένα χημικά καθορισμένο ικρίωμα, το οποίο, σε αντίθεση με το matrigel, στερείται οποιονδήποτε ενσωματωμένο αυξητικό παράγοντα, δημιουργήσαμε υδρογέλες που αποτελούνταν από συστατικά της ECM, όπως κολλαγόνο I, φιβρονεκτίνη και ινωδογόνο. Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.29-3.31 τα αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνταν από hPSC-cSMC:EC καθώς και hPSC-sSMC:EC παρουσίασαν ένα προφίλ εκβλαστήσεων παρόμοιο με εκείνο που εμφάνιζαν στο matrigel. Είναι ενδιαφέρον ότι τα hPSC-SMC+EC ως μονήρη κύτταρα δεν κατάφεραν να δημιουργήσουν οποιοδήποτε δίκτυο όταν τοποθετήθηκαν σε αυτά τα χημικά καθορισμένα ικρίωματα (Εικόνες 3.29, 3.30, 3.31). Τέλος, ένα αντίστοιχο προφίλ εκβλαστήσεων στις υδρογέλες εμφάνισαν αγγειακά οργανοειδή τα οποία αντί για πρωτογενή EC αποτελούνταν από hESC-EC και hPSC-SMC (Εικόνα 3.32).



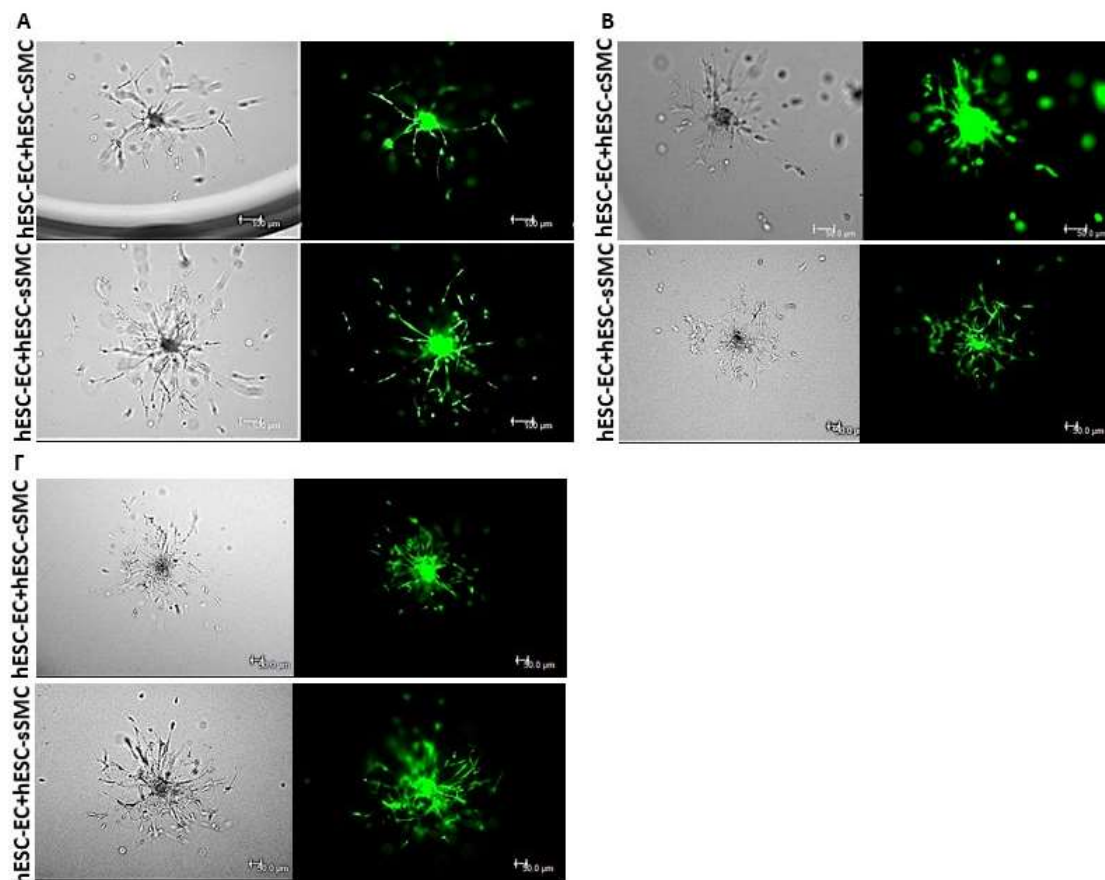
Εικόνα 3.30 Τα *hPSC-cSMC:EC*, *hPSC-sSMC:EC* αγγειακά οργανοειδή σχηματίζουν περισσότερες και μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με τα σφαιροειδή των *EC* σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης. **A** Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνται από *hESC-cSMC/hESC-EC*, *hESC-sSMC/hESC-EC* ή *hiPSC-cSMC/EC*, *hiPSC-sSMC/EC* με αναλογία 1/9, και σφαιροειδή *EC*, 1.000 συνολικά κυττάρων, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων και μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν το σχετικό μήκος και τον σχετικό αριθμό των εκβλαστήσεων που σχημάτισαν οι δομές αυτές έπειτα από 24h. Ο αριθμός και το μήκος των εκβλαστήσεων ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό *imageJ*. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,001$. **B**. Οι εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών 24h μετά την μεταφορά τους σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης, οι οποίες λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού

ολικής εσωτερικής ανάκλασης. Γ. Τα hPSC-SMC+EC ή τα EC ως μονήρη κύτταρα δεν δημιουργούν δίκτυο σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης. Τα hESC-cSMC/EC, hESC-sSMC/EC, hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC με αναλογία 1/9 και τα EC ως μονήρη κύτταρα μεταφέρθηκαν σε υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης, 24h μετά την προσθήκη τους στην υδρογέλη κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης.



Εικόνα 3.31 Τα hPSC-cSMC:EC, hPSC-sSMC:EC αγγειακά οργανοειδή σχηματίζουν περισσότερες και μακρύτερες εκβλαστήσεις σε σχέση με τα σφαιροειδή των EC σε υδρογέλη ινωδογόνου. Α. Αγγειακά οργανοειδή που αποτελούνται από hESC-cSMC/hESC-EC, hESC-sSMC/hESC-EC ή hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC με αναλογία 1/9, και σφαιροειδή EC, 1.000 συνολικά κυττάρων, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων και

μεταφέρθηκαν σε μία υδρογέλη ινωδογόνου. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν το σχετικό μήκος και τον σχετικό αριθμό των εκβλαστήσεων που σχημάτισαν οι δομές αυτές έπειτα από 24h. Ο αριθμός και το μήκος των εκβλαστήσεων ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό *imageJ*. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,001$. **B.** Οι εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών 24h μετά την μεταφορά τους σε υδρογέλη ινωδογόνου, οι οποίες λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης. **Γ.** Τα hPSC-SMC+EC ή τα EC ως μονήρη κύτταρα δε δημιουργούν δίκτυο σε υδρογέλη ινωδογόνου. Τα hESC-cSMC/EC, hESC-sSMC/EC, hiPSC-cSMC/EC, hiPSC-sSMC/EC με αναλογία 1/9 και τα EC ως μονήρη κύτταρα μεταφέρθηκαν σε υδρογέλη ινωδογόνου. Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης, 24h μετά την προσθήκη τους στην υδρογέλη ινωδογόνου.



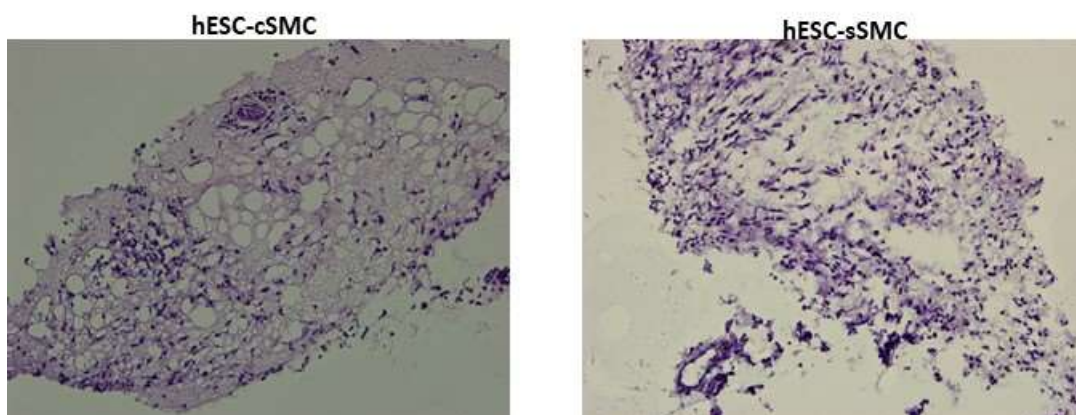
Εικόνα 3.32 Τα hESC-EC εμφανίζουν ίδια λειτουργικότητα με τα πρωτογενή EC όταν οργανώνονται σε αγγειακά οργανοειδή *in vitro*. Αγγειακά οργανοειδή 1.000 συνολικά κυτάρων, που αποτελούνται από hESC-cSMC/hESC-EC είτε από hESC-sSMC/hESC-EC με αναλογία 1/9, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των κρεμάμενων σταγόνων και μεταφέρθηκαν σε υδρογέλη *matrigel* (A), κολλαγόνου (B) ή κολλαγόνου/φιμπρονεκτίνης (Γ). Οι εικόνες αποτελούν φωτογραφίες των κυττάρων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει το συνολικό κυτταρικό πληθυσμό (και τους δύο τύπους κυττάρων) έπειτα από χρώση με καλσεΐνη.

3.8 Η λειτουργικότητα των hESC-cSMC, hESC-sSMC *in vivo*

Αρχικά, θελήσαμε να διερευνήσουμε την ικανότητα των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC να επάγουν την αγγειογένεση, όταν χορηγούνται μόνα τους ή τη δημιουργία ενός ώριμου αγγειακού δικτύου όταν χορηγούνται μαζί με τα EC *in vivo*, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία εμφύτευσης matrigel σε επίμυες (matrigel plug assay).

3.8.1 Τα hPSC-cSMC και τα hPSC-sSMC δεν επάγουν την αγγειογένεση όταν χορηγούνται μόνα τους

Για να διερευνήσουμε αν τα hESC-cSMC ή τα hESC-sSMC μπορούσαν να προκαλέσουν τη δημιουργία νέων αγγείων τα χορηγήσαμε ως μονήρη κύτταρα με matrigel σε επίμυες. Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη τριχοειδών ακόμη και 20 ημέρες μετά την εμφύτευή τους επιβεβαιώνοντας το μη αγγειογενετικό χαρακτήρα αυτών των κυττάρων (Εικόνα 3.33).



Εικόνα 3.33 Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC δεν επάγουν την αγγειογένεση *in vivo*. Τα hESC-cSMC, hESC-sSMC εμφυτεύθηκαν μόνα τους, ως μονήρη κύτταρα σε ποντίκια για 20 ημέρες. Οι εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τομές των εμφυτευμάτων έπειτα από χρώση με ιωσίνη/αιματιξυλίνη.

3.8.2 Ταχύτερο και πιο ώριμο δίκτυο σχηματίζεται μετά τη συγχρήση hESC-SMC και EC σε σχέση με τη χορήγηση μόνο EC

Μετά την υποδόρια εμφύτευσή EC και hESC-SMC+EC ως μονήρη κυττάρων (4 ημέρες) παρατηρήθηκαν περισσότεροι αγγειακοί αυλοί με κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης (hCD31+) και με μία ευρύτερη κατανομή ως προς τη διαμέτρο των αγγείων στα εμφυτεύματα που περιείχαν και τους δύο τύπους κυττάρων, σε σύγκριση με τα

εμφυτεύματα που περιείχαν μόνο EC (Εικόνα 3.34A,B), υποδηλώνοντας το πλεονέκτημα που προσφέρει η παρουσία των hESC-SMC στην ανάπτυξη ενός ώριμου αγγειακού δικτύου.

3.9 Η λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών/σφαιροειδών *in vivo*

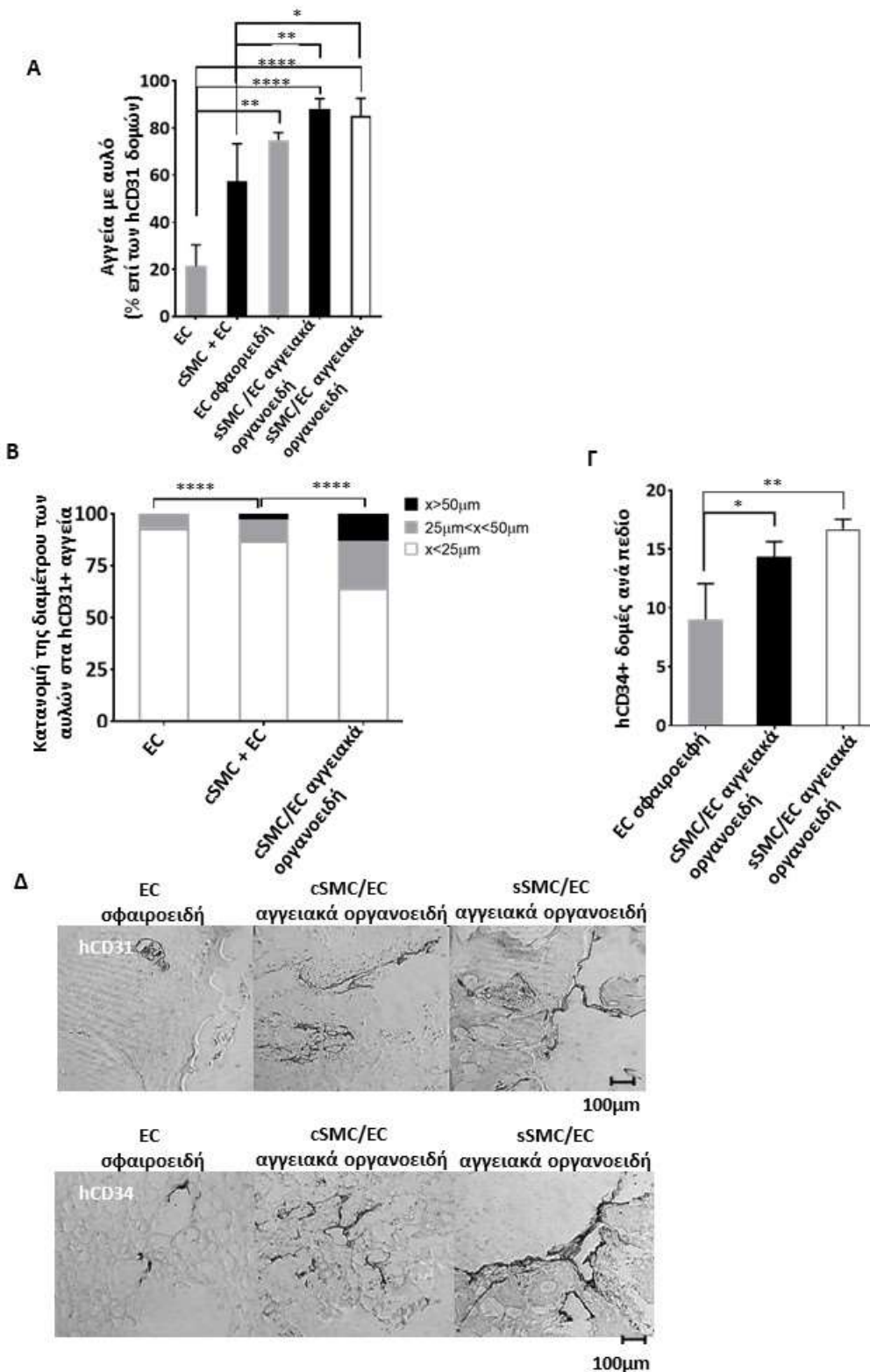
Η δημιουργία 3D κυτταρικών δομών επιτρέπει τη φυσική επαφή/αλληλεπίδραση των κυττάρων και αυξάνει την επιβίωσή τους. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η σφαιροειδής συσσωμάτωση σταθεροποιεί τα EC επιτρέποντάς τους ωστόσο να ανταποκρίνονται στη δράση των σημάτων επιβίωσης [230]. Χορηγώντας τον ίδιο αριθμό κυττάρων συνολικά ως μονήρη αλλά και ως σφαιροειδή θελήσαμε να ελέγξουμε τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η δομή αυτή κατά τη δημιουργία ενός αγγειακού δικτύου *in vivo*.

3.9.1 Τα αγγειακά οργανοειδή/σφαιροειδή οδηγούν σε ταχύτερη ανάπτυξη ενός δικτύου σε σχέση με τα μονήρη κύτταρα

Σχηματίστηκαν περισσότεροι αυλοί αγγείων με κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης (hCD31+) μετά από την εμφύτευση αγγειακών οργανοειδών (hESC-cSMC:EC, hESC-sSMC:EC) και σφαιροειδών EC συγκριτικά με εμφυτεύματα που περιείχαν hESC-cSMC+EC και EC ως μονήρη κύτταρα (Εικόνα 3.34A). Περαιτέρω ανάλυση ως προς τη διάμετρο των αγγείων που δημιουργήθηκαν και ταξινόμηση με βάση το μέγεθός τους αποκάλυψε ότι περισσότεροι hCD31 θετικοί αυλοί αγγείων και με μεγαλύτερη διάμετρο αναπτύχθηκαν στα εμφυτεύματα που περιείχαν hESC-cSMC:EC αγγειακά οργανοειδή, σε σύγκριση με εμφυτεύματα που περιείχαν μονήρη κύτταρα (είτε αυτά ήταν μεικτά είτε αποτελούνταν μόνο από EC) (Εικόνα 3.34B).

3.9.2 Τα αγγειακά οργανοειδή οδηγούν σε ταχύτερη ανάπτυξη ενός ώριμου δικτύου σε σχέση με τα σφαιροειδή EC

Δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί πως τα σφαιροειδή που αποτελούνται από EC, όταν εμφυτεύονται *in vivo* με matrigel, χρησιμεύουν ως εστίες εκκίνησης τριχοειδικών εκβλαστήσεων [231],[232], θελήσαμε να ελέγξουμε την υπόθεση μας ότι τα αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από hESC-SMC (cSMC ή sSMC):EC, όταν εμφυτεύονται με matrigel σε επίμυες, θα οδηγήσουν σε ταχύτερη ανάπτυξη ενός ώριμου αγγειακού δικτύου, σε σύγκριση με τα εμφυτεύματα που περιείχαν σφαιροειδή αποτελούμενα μόνο από EC. Πράγματι, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερες

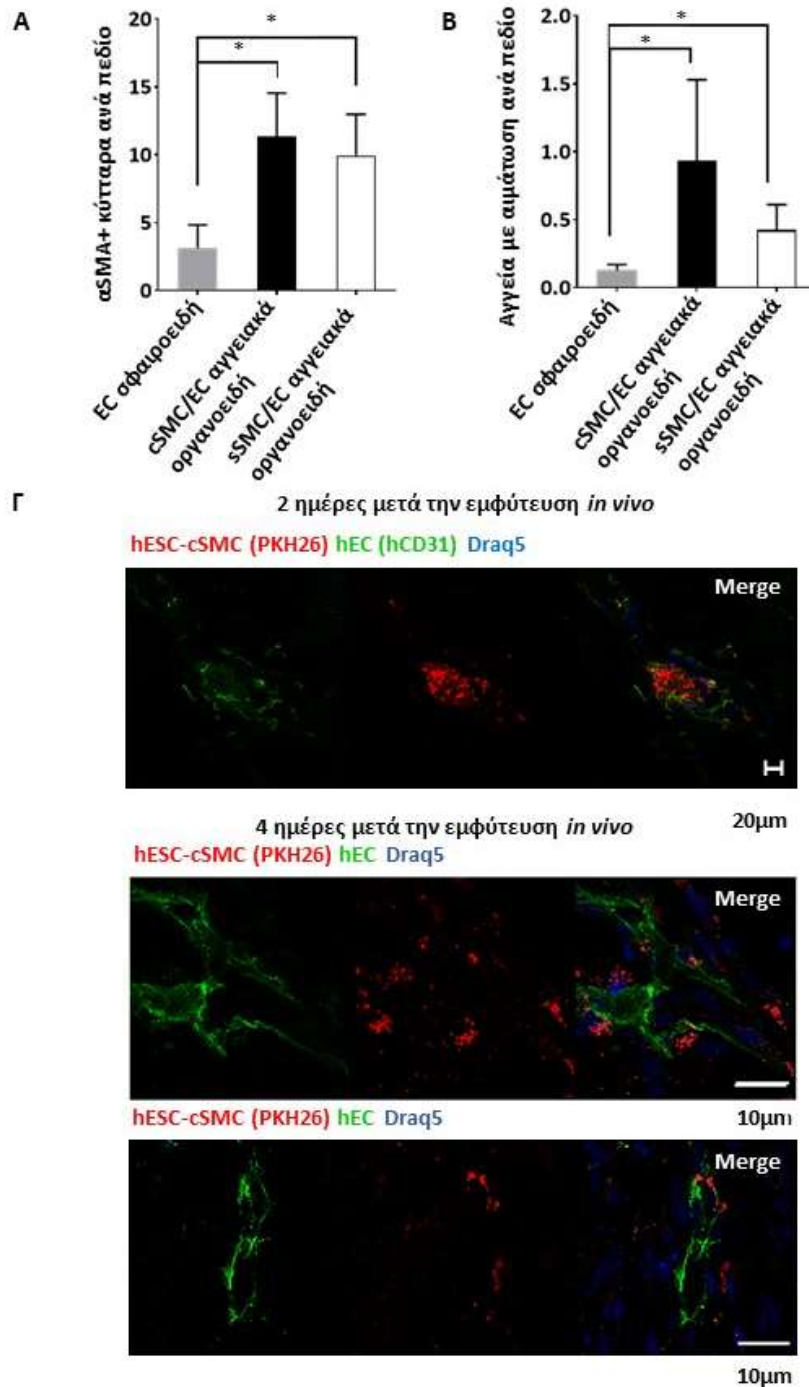


Εικόνα 3.34 Χαρακτηρισμός του αγγειακού δικτύου που δημιουργούν τα hESC-SMC ως μονήρη με EC είτε ως αγγειακά οργανοειδή. **A** Τα EC, hESC-cSMC+EC ως μονήρη κύτταρα και τα σφαιροειδή των EC, τα hESC-cSMC/EC και τα hESC-sSMC/EC αγγειακά οργανοειδή εμφυτεύθηκαν *in vivo* για 4 ημέρες. Έπειτα από χρώση ανοσοιστοχημείας οι αγγειακοί αυλοί ανθρωπίνης προέλευσης (anti-hCD31 θετικοί) ποσοτικοποιήθηκαν ανά πεδίο και

εκφράστηκαν ως ποσοστό ως προς τις συνολικές anti-hCD31 θετικές δομές και παρουσιάζονται στο γράφημα. **B.** Το διάγραμμα παρουσιάζει την κατανομή της διαμέτρου των αγγείων που δημιουργήθηκαν από κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης στα εμφυτεύματα που αποτελούνταν από EC, hESC-cSMC+EC ως μονήρη κύτταρα και hESC-cSMC/EC αγγειακά οργανοειδή, 4 ημέρες μετά την εμφύτευσή τους. **Γ.** Το διάγραμμα παρουσιάζει τον αριθμό των hCD34 θετικών δομών στα εμφυτεύματα σφαιροειδών EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC αγγειακών οργανοειδών, 4 ημέρες μετά την εμφύτευσή τους. **A, B, Γ.** Όλες οι ποσοτικοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 5 πεδία ανά τομή και σε 3 τομές για κάθε εμφύτευμα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (4 ζώα ανά συνθήκη). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. **Δ.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές που σημάνθηκαν μέσω ανοσοιστοχημείας με αντισώματα έναντι των δεικτών hCD34 και hCD31. Οι τομές προερχόταν από εμφυτεύματα στα οποία είχαν χορηγηθεί σφαιροειδή των EC είτε hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC αγγειακά οργανοειδή για 4 ημέρες.

αγγειακές δομές προερχόμενες από ανθρώπινα κύτταρα που εκφράζαν CD31 (hCD31+) στα εμφυτεύματα που αποτελούνταν από hESC-SMC (cSMC και sSMC):EC αγγειακά οργανοειδή σε σύγκριση με τα εμφυτεύματα που αποτελούνταν από σφαιροειδή EC (Εικόνα 3.34). Επίσης, τα εμφυτεύματα με hESC-sSMC:EC αγγειακά οργανοειδή είχαν περισσότερες hCD34 θετικές δομές σε σύγκριση με εμφυτεύματα αποτελούμενα από hESC-cSMC:EC αγγειακά οργανοειδή, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση του CD34 σε EC, όταν αυτά συγκαλλιεργούνταν με hESC-sSMC *in vitro* (Εικόνα 3.34). Επιπλέον, τα ανθρώπινα αγγεία που προέκυψαν από εμφύτευση των hESC-cSMC:EC και των hESC-sSMC:EC αγγειακών οργανοειδών, σχημάτισαν καλύτερη αναστόμωση με το αγγειακό δίκτυο των επίμυων και εμφάνισαν περισσότερα αιμοφόρα αγγεία με αιμάτωση σε σύγκριση με τα εμφυτεύματα που περιείχαν σφαιροειδή EC (Εικόνα 3.35). Τέλος, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.35 στα εμφυτεύματα που περιείχαν τα hESC-cSMC:EC ή τα hESC-sSMC:EC αγγειακά οργανοειδή, αναπτύχθηκαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερα αιμοφόρα αγγεία που καλύπτονταν με τοιχωματικά αγγειακά κύτταρα (α SMA+ κύτταρα), σε σύγκριση με τα εμφυτεύματα που περιείχαν σφαιροειδή EC, υποδεικνύοντας αγγειακή μυογένεση με πιθανή προέλευση των τοιχωματικών αγγειακών κυττάρων τα hESC-cSMC και τα hESC-sSMC που εμφυτεύθηκαν.

Για να ελεγχθεί η προέλευση των MC στα νεοσχηματισθέντα αγγεία, διεξήχθησαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από hESC-cSMC/hESC-sSMC σημασμένα με κόκκινη μεμβρανική



Εικόνα 3.35 Η εμφύτευση αγγειακών οργανοειδών οδηγεί στην ταχεία δημιουργία ώριμων αγγείων *in vivo*. **A.** Τομές από εμφυτεύματα σφαιροειδών των EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC αγγειακών οργανοειδών 4 ημέρες μετά την εμφύτευσή τους *in vivo*, μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη αSMA. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων ανά μικροσκοπικό πεδίο ποσοτικοποιήθηκε και παρουσιάζεται στο γράφημα. **B.** Ο αριθμός των αγγειακών δομών που περιέχουν ερυθρά αιμοσφαίρια ανά μικροσκοπικό πεδίο στα εμφυτεύματα σφαιροειδών EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC αγγειακών οργανοειδών, 4 ημέρες μετά την εμφύτευση παρουσιάζονται στο γράφημα. **A, B.** Όλες οι ποσοτικοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 5 πεδία ανά τομή και σε 3 τομές για κάθε εμφύτευμα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τιμές

της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (4 ζώα ανά συνθήκη) * $P < 0.05$. Γ. Ανάλυση μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού τομών από εμφυτεύματα σφαιροειδών των EC, hESC-cSMC/EC και hESC-sSMC/EC αγγειακών οργανοειδών 2 και 4 ημέρες μετά την εμφύτευση. Ο πράσινος φθορισμός υποδηλώνει τα hEC (χρώση έναντι του hCD31), ο κόκκινος φθορισμός υποδηλώνει τα hESC-cSMC ή τα hESC-sSMC (χρώση με Draq5). Οι εικόνες λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 και είναι αντιπροσωπευτικές από 2 ζώα (2 ημέρες) και 4 ζώα (4 ημέρες).

φθορίζουσα χρωστική και μη σημασμένα EC, τα οποία εμφυτεύθηκαν σε ποντικούς. Δύο ημέρες μετά την εμφύτευση, τα EC άρχισαν να σχηματίζουν αυλούς που προέρχονταν από τα οργανοειδή. Ανάλυση μέσω ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι τα σημασμένα με κόκκινη χρωστική cSMC βρίσκονταν σε στενή γειτνίαση με τις ενδοθηλιακές εκβλαστήσεις (χρώση των ανθρώπινων EC με hCD31), υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την ανθρώπινη προέλευση των MC στα νεοσχηματισθέντα αγγεία (Εικόνα 3.35). Πράγματι, 4 ημέρες μετά την εμφύτευση των οργανοειδών, τα σημασμένα με κόκκινη χρωστική hESC-cSMC και hESC-sSMC ανιχνεύθηκαν δίπλα στις δημιουργούμενες ανθρώπινες αγγειακές δομές (Εικόνα 3.35). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα συμμετοχής και PC ή SMC προερχόμενων από τον ξενιστή (επίμυες). Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται ότι τα αγγειακά οργανοειδή σε αντίθεση με τα σφαιροειδή EC οδηγούν στη δημιουργία ενός ώριμου αγγειακού δικτύου ήδη από την 4^η ημέρα μετά την εμφύτευσή τους *in vivo*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη της μεταγωγής του σήματος του VEGF στον μεσοδερματικό πληθυσμό που οδηγεί σε EPC κατά τη διαφοροποίηση των hESC σε EC

Ο VEGF είναι ο κύριος αυξητικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία των EC κατά την εμβρυογένεση (αγγειοποίηση) και την αγγειογένεση. Παρόλο που τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον VEGF έχουν μελετηθεί εκτενώς σε πρωτογενή EC, λίγα είναι γνωστά για την επαγόμενη από τον VEGF σηματοδότηση κατά την αγγειοποίηση. Τα hPSC αποτελούν ένα ιδανικό μοντέλο για την ανάπτυξη διαδικασιών διαφοροποίησης, που μιμούνται αυτές της εμβρυικής ανάπτυξης του ανθρώπου, ενώ ταυτόχρονα καθιστούν εφικτή τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που τις διέπουν [246]. Η απουσία όμως πρωτοκόλλων διαφοροποίησης των hPSC προς EPC εξαρτώμενων αποκλειστικά από τον VEGF και μάλιστα σε χημικά καθορισμένες συνθήκες, έχει ως αποτέλεσμα να μην έχει διερευνηθεί επαρκώς η επαγόμενη από τον VEGF σηματοδότηση που είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση προς την ενδοθηλιακή σειρά. Στην παρούσα μελέτη για τη διαφοροποίηση των hESC σε EPC χρησιμοποιούμε ένα σύντομο πρωτόκολλο (5 ημέρες), δύο σταδίων, όπου πρώτα γίνεται επαγωγή της διαφοροποίησης των PSC προς μεσόδερμα (3^η ημέρα) και έπειτα των μεσοδερματικών κυττάρων προς EPC τα οποία έχουν μάλιστα χαρακτηριστεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας [234]. Το δεύτερο αυτό στάδιο εξαρτάται αποκλειστικά από τη δράση του VEGF και με αυτό τον τρόπο η συγκεκριμένη πειραματική διάταξη αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της σηματοδότησης του αυξητικού αυτού παράγοντα στα μεσοδερματικά κύτταρα. Ωστόσο, το ποσοστό διαφοροποίησης των κυττάρων προς EPC δεν ξεπερνά το 40% (κατά την 5^η ημέρα της διαφοροποίησης), το οποίο αν και είναι και από τα υψηλότερα που καταγράφονται στη βιβλιογραφία [182], υποδεικνύει ότι ένας υποπληθυσμός και όχι το σύνολο των μεσοδερματικών κυττάρων ανταποκρίνεται στον VEGF και είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία των EPC. Πράγματι ο έλεγχος της επιφανειακής έκφρασης του κυρίου υποδοχέα του VEGF (VEGFR2) στο σύνολο του μεσοδερματικού πληθυσμού κατέδειξε ότι μόνο ένα ποσοστό αυτών τον εκφράζει και άρα είναι σε θέση να ενεργοποιηθεί από τον VEGF. Περαιτέρω απομόνωση των κυττάρων που

εκφράζαν επιφανειακά τον VEGFR2 έδειξε ότι αυτά συνεκφράζαν και τον μεταγραφικό παράγοντα *etv2*, ο οποίος θεωρείται δείκτης δεσμευσης (commitment) των μεσοδερματικών κυττάρων στην ενδοθηλιακή σειρά [237]. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι αυτός ο υποπληθυσμός ανταποκρίνεται στον VEGF και οδηγεί στη δημιουργία των EPC, πραγματοποιήσαμε *in vivo* σήμανση των μεσοδερματικών κυττάρων που εκφράζαν τον VEGFR2 (3^η ημέρα της διαφοροποίησης) χρησιμοποιώντας ένα μη λειτουργικό φθορίζων αντίσωμα έναντι του VEGFR2 και παρακολούθηση της διαφοροποίησής τους. Διαπιστώσαμε ότι τα περισσότερα από τα EPC (5^η ημέρα της διαφοροποίησης) έφεραν το φθορισμό του αντι-VEGFR2 αντισώματος που είχε χρησιμοποιηθεί. Βέβαια ένα ποσοστό των EPC της τάξης του 20% ήταν αρνητικό ως προς αυτό το φθορισμό. Η απώλεια του φθορισμού ή η διατήρηση του μεν, αλλά σε ποσοστά χαμηλότερα της ανιχνευτικής ικανότητας της κυτταρομετρίας ροής θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν αυτό το γεγονός, πόσο μάλλον αν συνυπολογιστεί και η πιθανότητα κυτταρικής διαίρεσης στη διάρκεια του 48ωρου (3^η έως 5^η ημέρα διαφοροποίησης).

Προκειμένου να μελετηθεί η μεταγωγή του σήματος του VEGF στον μεσοδερματικό κυτταρικό υποπληθυσμό "στόχο", επιχειρήθηκε απομόνωση των κυττάρων που εξέφραζαν το VEGFR2 με κυτταρομετρία ροής και επανακαλλιέργειά τους, ώστε να ενεργοποιηθούν στη συνέχεια από τον VEGF και να μελετηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια. Δυστυχώς, τα κύτταρα αυτά δεν μπόρεσαν να προσκολληθούν ξανά μετά την απομόνωσή τους, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις κυττάρων μετά από απομόνωσή τους με κυτταρομετρία ροής. Για το λόγο αυτό αναγκαστήκαμε να ελέγξουμε τη μεταγωγή του σήματος του VEGF στον συνολικό μεσοδερματικό πληθυσμό, αποδεχόμενοι ότι τα αποτελέσματά μας θα επηρεαστούν και συγκεκριμένα η επίδραση του VEGF θα εμφανιστεί πιο μετριασμένη λόγω του «θορύβου» από την παρουσία των μη ανταποκρινόμενων στο VEGF κυττάρων. Αρχικά, ο έλεγχος των φωσφορυλιώσεων καθοδικών τελεστών του VEGF όπως οι PLCγ, AKT, ERK1/2, ELF2 κατέδειξε ενεργοποίηση τους αντίστοιχη με αυτή που λαμβάνει χώρα στα πρωτογενή EC. Περαιτέρω μελέτη στο επίπεδο της μεταγραφής έδειξε επαγωγή στην έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών της ενδοθηλιακής σειράς (CD34, CD31, ve-cadherin, *etv2*, *tie2*, *ehrinb4*, *nrp1*, *nrp2*).

Φαίνεται λοιπόν, ότι ο VEGF συνολικά κινητοποιεί τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια στα πρωτογενή EC (αγγειογένεση) και στα μεσοδερματικά κύτταρα (αγγειοποίηση).

Συμπερασματικά, λοιπόν, στην παρούσα μελέτη αναγνωρίσαμε τον μεσοδερματικό υποπληθυσμό που είναι στόχος του VEGF και που οδηγεί στη δημιουργία των EPC και διαπιστώσαμε ομοιότητες στη μεταγωγή του σήματος του VEGF στα μεσοδερματικά κύτταρα σε σχέση με τα πρωτογενή EC.

4.2 Διαφοροποίηση των hPSC σε δύο διακριτούς φαινότυπους των SMC

Στην τρέχουσα μελέτη, αναπτύξαμε μια γρήγορη μέθοδο για τη δημιουργία cSMC και sSMC από hPSC, που πέραν του ότι οδηγεί στη δημιουργία των δύο αυτών τύπων κυττάρων, αποτελεί ιδανικό πρωτόκολλο για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις διαφοροποιήσεις αυτές. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας [233] τα hiPSC μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του μεσοδέρματος, έπειτα από επαγωγή με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση ορού έως 10% για 20 ημέρες. Δεδομένου ότι ο ορός καταστέλλει την έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών [41], χρησιμοποιώντας ένα σύντομο πρωτόκολλο (11 ημέρες), κατά το οποίο γίνεται επαγωγή με μειωμένο ορό, διαφοροποιήσαμε επιτυχώς τα hPSC σε άωρα cSMC. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά είχαν χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, εκφράζαν τον δείκτη των τοιχωματικών αγγειακών κυττάρων NG2, καθώς και τους μεσοδερματικούς δείκτες CD29, CD44, CD73, CD105. Επίσης, εκφράζαν σε υψηλά επίπεδα τους πρώιμους συστατικούς δείκτες αSMA, Calponin και SM22α και για το λόγο αυτό συσπώνταν όταν εκτέθηκαν σε ένα χολινεργικό αγωνιστή (καρβαχόλη) [247],[248]. Παράλληλα όμως εμφάνιζαν χαμηλή έκφραση του δείκτη ωρίμανσης των SMC, SMMHC. Η δημιουργία cSMC από hiPSC έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη [249] χρησιμοποιώντας, όμως, ένα πιο χρονοβόρο πρωτόκολλο διαφοροποίησης, μέσω ενός ενδιάμεσου πληθυσμού μεσεγγυμαγγειοβλαστών, με έκθεση των κυττάρων αρχικά σε υψηλές και έπειτα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ορού [238]. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαφοροποίησης που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη, ο συνδυασμός χαμηλών συγκεντρώσεων ορού και η επακόλουθη ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε υπόστρωμα ζελατίνης, μίγμα πρωτεϊνών της ECM, ήταν επαρκής για να δημιουργηθεί

γρήγορα ένας άωρος φαινότυπος των cSMC (υψηλή έκφραση αSMA/Calponin/SM22, χαμηλή έκφραση SMMHC), που παρέμενε σταθερός για τουλάχιστον 8 γενεές. Περαιτέρω, βραχεία επαγωγή με TGFβ1 [250] και ηπαρίνη [251] προκάλεσε την περαιτέρω ωρίμανση των hPSC-cSMC, όπως αυτή επιβεβαιώθηκε από την αύξηση της έκφρασης του SMMHC, του χαρακτηριστικότερου δείκτη ωρίμανσης των cSMC, καθώς και τη μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων αυτών [238].

Για τη μετάβαση των hPSC-cSMC σε sSMC (hPSC-sSMC), φαινότυπο που απαντάται κατά τη διαδικασία της νεοαγγείωσης, την εμβρυική ανάπτυξη και σε τραυματισμένα ή νοσούντα αγγεία μέσα στο πλαίσιο της αγγειακής αναδιαμόρφωσης [41], έγινε επαγωγή τους με τον παράγοντα FGF2. Πρόκειται για ένα μιτογόνο παράγοντα, που είναι γνωστό ότι προωθεί τη μετάβαση πρωτογενών vSMC σε sSMC [241]. Πράγματι, σύντομη έκθεση σε FGF2 (2 ημέρες) ήταν ικανή να οδηγήσει σε μείωση της έκφρασης των συστατικών πρωτεϊνών αSMA, Calponin και SM22a και άρα στην ανάπτυξη φαινότυπου σύμφωνου με αυτόν των sSMC (hPSC-sSMC). Επιπλέον, τα hPSC-sSMC παρουσίαζαν χαρακτηριστικές λειτουργίες των sSMC [252],[247], όπως αυξημένο πολλαπλασιασμό, μεταναστευτική ικανότητα, εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM και αυξημένη δραστικότητα της MMP-2 και 9 σε σύγκριση με τα hPSC-cSMC.

Τόσο τα hPSC-cSMC όσο και τα hPSC-sSMC εμφάνιζαν παρόμοιο δυναμικό ολιγοδυναμίας και συγκεκριμένα είχαν την ικανότητα να διαφοροποιούνται περαιτέρω προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, ένα τυπικό χαρακτηριστικό των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων (mesenchymal precursors), που όμως έχει περιγραφεί και σε MC [48],[243],[244]. Υποστηρίζεται μάλιστα ότι ορισμένα από τα ολιγοδύναμα κύτταρα του στρώματος ενηλίκων (adult multipotent stromal cells) είναι στην πραγματικότητα ένα υποσύνολο των MC [48]. Σε συμφωνία με αυτό, έχει επιβεβαιωθεί η *in vitro* διαφοροποίηση των PC προς τις τρεις κατευθύνσεις (οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα) [48],[253], ωστόσο η δυνατότητα αυτή έχει αμφισβητηθεί στα SMC [254],[255]. Χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις χαρτογράφησης (fate mapping) και ανίχνευσης προέλευσης (lineage tracing), η δυνατότητα ολιγοδυναμίας των SMC (διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα), έχει αποδοθεί είτε σε μια διαδικασία επαναπρογραμματισμού των διαφοροποιημένων SMC προς ολιγοδύναμα προγονικά κύτταρα [243],[244] είτε στην

παρουσία ενός υποπληθυσμού προγονικών κυττάρων, όπως ολιγοδύναμων αγγειακών βλαστικών κυττάρων (multipotent vascular stem cells, MVSC) στην καλλιέργεια των SMC, που μπορεί να διαφοροποιηθεί περαιτέρω είτε στους δύο υπότυπους των SMC, είτε προς άλλα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης [256], είτε σε έναν άλλο μεσεγχυματικό πρόδρομο κυτταρικό τύπο [249]. Η έλλειψη ομοιογένειας στην καλλιέργεια των SMC σε ένα συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης, που μπορεί να περιλαμβάνει μη ώριμα και μερικώς διαφοροποιημένα MVSC καθώς και η απουσία εξειδικευμένου δείκτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανίχνευσης προέλευσης (lineage tracing), έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των απόψεων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία [254],[255]. Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται ότι τα hPSC-cSMC της παρούσας μελέτης, έχοντας έναν σχετικά άωρο φαινότυπο (υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, χαμηλή έκφραση SMMHC), διέθεταν και τη δυνατότητα της ολιγοδυναμίας. Από την άλλη, δεν μπορεί να αποκλειστεί όμως και η ύπαρξη ενός ατελώς διαφοροποιημένου υποπληθυσμού SMC στην καλλιέργεια των hPSC-SMC.

Τα MC σταθεροποιούν το αγγειακό σύστημα τόσο μέσω παρακρινούς δράσης όσο και αλληλεπιδρώντας μέσω επαφής με τα γειτονικά EC [31]. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός των cSMC και των sSMC που προέρχονται από τα hPSC σχετικά με τη λειτουργία τους ως MC είναι περιορισμένος στη βιβλιογραφία. Η παρούσα μελέτη, αποκάλυψε ότι και οι δύο τύποι κυττάρων μπόρεσαν να ενσωματώθούν στο δίκτυο που σχηματίζουν τα EC σε διάφορες υδρογέλες και να αναστείλλουν την υποστροφή αυτού, δύο βασικές ιδιότητες των MC, με εφαρμογές στον τομέα της MI. Ταυτόχρονα, τόσο τα AD-MSC όσο και τα hiPSC-MSC [233] απέτυχαν να αναστείλλουν την υποστροφή του δικτύου των EC. Φαίνεται, λοιπόν, πως τα hPSC-SMC, αν και παρουσιάζουν κάποια φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των MSC, λειτουργούν κυρίως ως MC. Ακόμη, η καλλιέργεια των EC πάνω σε μονοστιβάδες αμφότερων των cSMC και sSMC οδήγησε σε οργάνωση τους σε δίκτυο. Ειδικότερα, τα sSMC επάγαν τη δημιουργία ενός πιο πολύπλοκου και αναπτυγμένου δικτύου των EC σε σύγκριση με τα cSMC, όπως αυτό προέκυψε από την ανάλυση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών του δικτύου, την εναπόθεση συστατικών της βασικής μεμβράνης και την παρουσία υψηλότερου ποσοστού EC που εκφράζαν το δείκτη των EC κορυφής, CD34 [16]. Αυτή η διαφορετική επίδραση των δύο υποτύπων

των SMC στα EC, μπορεί να οφείλεται είτε σε διαφορές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο υποτύπων των SMC με τα EC, είτε σε διαφορές στην εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM (φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο IV). Συγκεκριμένα, η αυξημένη εναπόθεση από τα sSMC, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως προσωρινή-πρωταρχική εξωκυττάρια μήτρα (provisional matrix), που προάγει την οργάνωση των EC. Αυτή η διαφορετική δραση των sSMC έρχεται σε συμφωνία με τον φυσιολογικό ρόλο των sSMC, όπως αυτός έχει περιγραφεί κατά τη διάρκεια τόσο της νεοαγγείωσης στο έμβρυο όσο και της αγγειακής αναδιαμόρφωσης (vascular remodeling) στα αιμοφόρα αγγεία των ενηλίκων [41]. Σύμφωνα λοιπόν με αυτά τα ευρήματα, φαίνεται πως οι παραγόμενοι υπότυποι των SMC θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη μελέτη των διεργασιών που ευθύνονται για την ανάπτυξη ασθενειών που εμπλέκουν αυτούς τους κυτταρικούς υπότυπους, όσο και ως δομικά στοιχεία για την κατασκευή φυσιολογικών αγγείων. Συγκεκριμένα, η χρήση ενός μάλλον ανώριμου, πλην σταθερού hPSC-cSMC φαινότυπου, που διαθέτει την ικανότητα πολλαπλασιασμού (σε αντίθεση με τα ώριμα cSMC), αλλά και τη δυνατότητα περαιτέρω ωρίμανσης, μπορεί να είναι ωφέλιμη για εφαρμογές στον τομέα της MI.

4.3 Δημιουργία 3D δομών (αγγειακών οργανοειδών) αποτελούμενων από hPSC-SMC και EC

Η χορήγηση κυττάρων *in vivo* μέσα στα πλαίσια της AI συνήθως χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό επιβίωσης αυτών [257]. Επιπλέον, η έλλειψη ομοιογένειας στην καλλιέργεια των SMC σε συγκεκριμένο στάδιο της διαφοροποίησης, σε συνδυασμό με τη φαινοτυπική πλαστικότητα των κυττάρων αυτών, καθώς και το γεγονός ότι ο φαινότυπος και η λειτουργία των SMC ρυθμίζονται στενά από το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται και από την οργάνωση τους εντός του ιστού [247], μπορεί να οδηγήσουν στην απόκτηση ενός δυσμενούς (φλεγμονώδους) φαινότυπου, όταν τα κύτταρα αυτά εμφυτεύθουν ως μονήρη σε ένα εχθρικό περιβάλλον [24]. Αυτά τα εμπόδια θα μπορούσαν να ξεπεραστούν με τη δημιουργία 3D κυτταρικών δομών (αγγειακά οργανοειδή μικρής κλίμακας) αποτελούμενων από EC και τους υπότυπους των SMC. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές 2D κυτταρικές καλλιέργειες μονοστιβάδων, οι 3D δομές αυτές επιτρέπουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

διαφορετικών τύπων κυττάρων, μιμούμενοι στενά το μικροπεριβάλλον ενός φυσιολογικού ιστού, με ευεργετικά αποτελέσματα στην κυτταρική επιβίωση, τη φαινοτυπική σταθερότητα και λειτουργία των επιμέρους κυττάρων όταν εμφυτεύονται *in vivo* [218],[219]. Το 1998 [230] δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά σφαιροειδή από EC που αποτέλεσαν ένα 3D *in vitro* μοντέλο που εμφάνιζε αγγειογενετικές ιδιότητες και συνάμα αποτελούσαν εστίες εκκίνησης εκβλαστήσεων *in vivo*. Από τότε τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή έχουν εξελιχθεί σε ένα σύστημα 3D καλλιέργειας κυττάρων, που αποτελείται από έναν ή περισσότερους τύπους κυττάρων, με πολλαπλές εφαρμογές [258]. Στην παρούσα μελέτη δημιουργήσαμε επιτυχώς, για πρώτη φορά 3D SMC-EC αγγειακά οργανοειδή με τους δύο υπότυπους των hPSC-SMC (cSMC και sSMC) και EC. Τυχαία ανάμειξη hPSC-cSMC:EC ή hPSC-sSMC:EC, με σταθερή αναλογία 1:9, οδήγησε στην αυτοοργάνωση αυτών σε μια 3D δομή, παρόμοια με τα σφαιροειδή πρωτογενών vSMC:EC [259], αναπαριστώντας τη φυσιολογική συγκρότηση ενός κανονικού αιμοφόρου αγγείου. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονταν από έναν πολυκυτταρικό πυρήνα, αποτελούμενο από τα SMC και από μία επιφανειακή μονοστιβάδα EC. Η όλη δομή θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα ανεστραμένο (μέσα-έξω) τοίχωμα αγγείου. Η φαινοτυπική ανάλυση των hPSC-SMC/EC αγγειακών οργανοειδών, έδειξε τη διατήρηση του φαινότυπου των hPSC-cSMC και των hPSC-sSMC στη δομή αυτή, καθώς τα hPSC-cMC:EC αγγειακά οργανοειδή χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των συστατικών πρωτεϊνών (Calponin, αSMA και SM22α) από τα hPSC-cSMC, ενώ τα hPSC-sMC:EC αγγειακά οργανοειδή παρουσιάζουν αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM, όπως φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο IV. Μεταφορά των παραγόμενων αγγειακών οργανοειδών σε υδρογέλη matrigel ή υδρογέλες που αποτελούνταν από συστατικά της ECM, οδήγησε στην ανάπτυξη εκβλαστήσεων, όμοια με την ανάπτυξη ενός δικτύου τριχοειδών. Αξιοσημείωτο είναι ότι στις εκβλαστήσεις αυτές οι δύο τύποι κυττάρων (hPSC-SMC και EC) συνεντοπίζονταν. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα MC χαρακτηρίζονται από υψηλή πλαστικότητα και ένα συνεχές φάσμα φαινοτύπων με τα PC των τριχοειδών αγγείων στο ένα άκρο, τα SMC των αρτηρίδιων και φλεβίδιων στο άλλο άκρο και τους ενδιάμεσους μεταβατικούς φαινοτύπους [25], δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι τα hPSC-SMC απέκτησαν έναν φαινότυπο πιο κοντινό στα PC στο δημιουργούμενο αγγειακό δίκτυο. Τα hPSC-sSMC/EC αγγειακά οργανοειδή

σχημάτιζαν εκβλαστήσεις μεγαλύτερου μήκους σε σύγκριση με τα hPSC-cSMC/EC, πιθανώς λόγω της υψηλότερης μεταναστευτικής τους ικανότητας και της υψηλότερης δραστηριότητας της παραγόμενης MMP2 (και επακόλουθης αποικοδόμησης της ECM) των hPSC-sSMC, παραμέτρων, δηλαδή, που σχετίζονται άμεσα με την αναδιαμόρφωση ενός αγγείου. Τα αγγειακά οργανοειδή αποτελούμενα από τους δύο υπότυπους των hPSC-SMC/EC ήταν πιο αποτελεσματικά από τα σφαιροειδή που αποτελούνταν μόνο από EC στο σχηματισμό εκβλαστήσεων, ενώ τόσο τα hPSC-SMC όσο και τα EC ως μονήρη κύτταρα απέτυχαν να δημιουργήσουν ένα δίκτυο όταν τοποθετήθηκαν σε υδρογέλες αποτελούμενες από συστατικά της ECM. Εν κατακλείδι, τα παραγόμενα SMC-EC αγγειακά οργανοειδή διατηρούσαν τα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των δύο υπότυπων των SMC, έχοντας τη δυνατότητα να δημιουργήσουν ένα ανθεκτικό (σε σύγκριση με αυτό των μονήρη κύτταρων) 3D αγγειακό δίκτυο *in vitro*.

4.4 Λειτουργικότητα των αγγειακών οργανοειδών *in vivo*

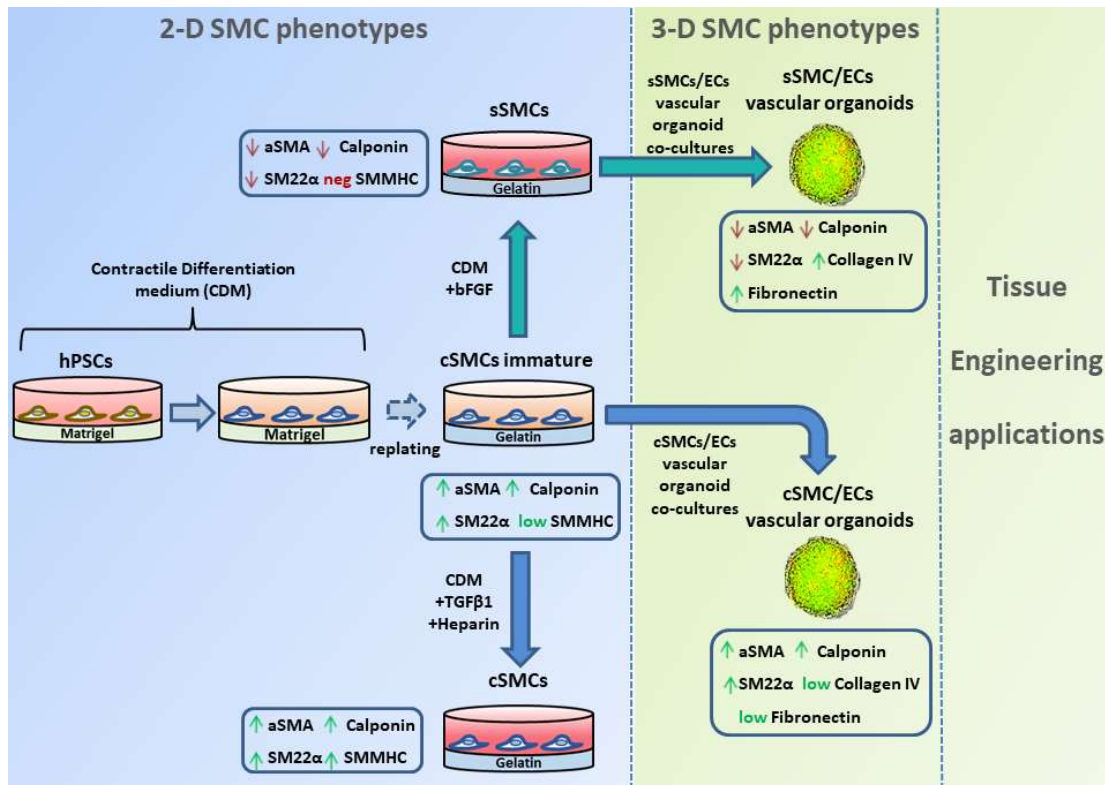
Στη συνέχεια, υποδόρια εμφύτευση σε ποντίκια των δύο τύπων hESC-SMC ως μονήρη κύτταρα, επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα αυτά δεν έχουν αγγειογεννητικό χαρακτήρα. Ωστόσο, όταν εμφυτεύθηκαν τα hESC-cSMC/sSMC:EC αγγειακά οργανοειδή όχι μόνο δημιούργησαν περισσότερες δομές αγγειακών αυλών και με μεγαλύτερη διάμετρο σε σύγκριση με εμφυτεύματα αποτελούμενα από EC και hESC-SMC:EC ως μονήρη κύτταρα, αλλά, επίσης, σχημάτισαν περισσότερες CD31+/CD34+ αγγειακές δομές ανθρώπινης προέλευσης, εμφάνισαν πιο εκτεταμένη αναστόμωση με το αγγειακό σύστημα του ξενιστή και περισσότερα αγγεία με αιματική ροή, σε σύγκριση με τα αγγεία στα εμφυτεύματα που περιείχαν σφαιροειδή αποτελούμενα από EC. Ως εκ τούτου, η δοκιμασία εμφύτευσης matrigel (matrigel plug assay) έδειξε την ικανότητα των hESC-cSMC/EC και των hESC-sSMC/EC αγγειακών οργανοειδών να αποτελούν εστίες εκκίνησης εκβλαστήσεων, που περιείχαν τα SMC και τα EC και να οδηγούν σε σύντομο χρονικό διάστημα στη δημιουργία ενός ώριμου αγγειακού δικτύου που αναστομώνεται με το αγγειακό δίκτυο του ξενιστή. Ωστόσο, αν και είδαμε ότι τα MC που εντοπίστηκαν στο αγγειακό δίκτυο είχαν ανθρώπινη προέλευση (σημασμένα hPSC-SMC), η συμμετοχή των MC του ξενιστή δεν μπορεί να αποκλειστεί. Μία

ευεργετική επίδραση των hESC-SMC στην επιβίωση των hEC [259] θα μπορούσε να εξηγήσει τον αυξημένο αριθμό αγγειακών δομών ανθρώπινης προέλευσης στα εμφυτεύματα με τα αγγειακά οργανοειδή σε σύγκριση με αυτά που περιείχαν τα σφαιροειδή των EC. Η προσέγγιση αυτή της κατασκευής 3D αγγειακών δομών είναι εύελικτη και αρκετά ευπροσάρμοστη, ώστε να επιτρέπει περαιτέρω τροποποιήσεις [260]. Συγκεκριμένα μπορεί να βρει εφαρμογές σε μοντέλα μελέτης νοσημάτων, δίνει τη δυνατότητα χορήγησης μέσω λιγότερο παρεμβατικών οδών (ενέσιμα) και επιτρέπει τη χρήση διαφορετικών τύπων ικριωμάτων.

Συνοπτικά, αναπτύξαμε ένα σύντομο πρωτόκολλο διαφοροποίησης των hPSC προς άωρα cSMC, τα οποία μετά από βραχεία έκθεση σε TGFβ1 και ηπαρίνη μπορούσαν να μετατραπούν σε έναν πιο ώριμο φαινότυπο, ενώ μετά από σύντομη επαγωγή με FGF2 μπορούσαν να μεταβούν σε sSMC. Η φαινοτυπική πλαστικότητα των vSMC είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αποκατάστασης των αγγειακών βλαβών και συνεπώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της επαναστένωσης και της αγγειοπάθειας κατά τη μεταμόσχευση (transplant vasculopathy) [24],[35]. Η καινοτόμος στρατηγική διαφοροποίησης που εφαρμόσαμε, σε αντίθεση με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης, των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη φαινοτυπική πλαστικότητα των παραγόμενων hPSC-SMC, χρησιμοποιώντας μια απλή πειραματική διάταξη. Δεδομένου ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των FGF-TGFβ αναφέρεται ως πρωταρχικός ρυθμιστής των φαινότυπων των SMC, το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για τη διερεύνηση αυτών των μηχανισμών.

Με βάση την πρόσφατη αντίληψη ότι τα MC αποτελούνται από ένα συνεχές φαινοτυπικό φάσμα, με τα PC στο ένα άκρο και τα SMC στο άλλο [41], φαίνεται ότι με το παρόν πρωτόκολλο διαφοροποίησης, δημιουργήθηκαν MC των οποίων τα χαρακτηριστικά εντοπίζονται στη φαινοτυπική περιοχή των SMC, χωρίς όμως να αποκλείεται η ύπαρξη μεταβατικών κυτταρικών τύπων. Επειδή η ετερογένεια και η χωροχρονική μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών είναι χαρακτηριστική των MC, θα πρέπει αυτή να λαμβάνεται υπόψη σε κάθε προσέγγιση στον τομέα της MI, όπου μπορεί, αναλογα με τις απαιτήσεις, να είναι επιθυμητή η διατήρηση ή η επαγωγή

ενός συγκεκριμένου λειτουργικού φαινότυπου των MC. Τα hPSC-cSMC, για παράδειγμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως "ομοιοστατική δεξαμενή" των vSMC σε περιπτώσεις χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων ή μεταμοσχεύσεων ιστών (όπως κατά τη μεταμόσχευση παγκρεατικών νησίδων), ενώ στην περίπτωση τραύματος το υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό των hPSC-sSMC θα ενίσχυε την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας και τη νεοαγγείωση τοπικά *in vivo*. Σε αυτό το πλαίσιο, η προσέγγιση μας, που περιλαμβάνει την κατασκευή 3D αγγειακών οργανοειδών αποτελούμενων από τους υπότυπους των hPSC-SMC και τα EC και η ανάλυση του φαινότυπου και της λειτουργίας τους, είναι καινοτόμος και αποτελεί το πρώτο βήμα στο σχεδιασμό πιο σύνθετων 3D δομών στον τομέα της MI, όπου μπορούν στη συνέχεια να ενσωματωθούν κύτταρα ενός συγκεκριμένου ιστού και οι κατάλληλοι αυξητικοί παράγοντες. Ρυθμίζοντας κάθε φορά τον φαινότυπο των MC θα είμαστε σε θέση να κατανοήσουμε καλύτερα τη λειτουργικότητα της πλαστικότητάς τους και τη συνεισφορά τους στην ομοίωση ενός οργάνου, αλλά και το ρόλο τους σε διάφορες ασθένειες. Για το σκοπό αυτό προτείνουμε ευέλικτα, μικρής κλίμακας 3D αγγειακά οργανοειδή, που αποτελούνται από hPSC-SMC/EC και φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά, σε σύγκριση με τα hPSC-SMC και τα EC ως μονήρη κύτταρα και τα σφαιροειδή που αποτελούνται μόνο από EC, ως προς την ανάπτυξη ενός ώριμου αγγειακού δικτύου *in vivo*. Επίσης, οι δομές αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες εφαρμογές στον τομέα της MI. Τέλος, μπορούν να αποτελέσουν ένα *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των EC και των υπότυπων των SMC παρακρινώς. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι σημαντικές καθώς ρυθμίζουν τη δημιουργία των αγγείων, τη διαμόρφωση του φαινότυπου των κυττάρων, την ωρίμανση, τη διατήρηση και αποσταθεροποίηση των αγγείων, με τρόπο που μιμείται τη φυσιολογική δημιουργία του αγγειακού δικτύου. Επομένως, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως μια πλατφόρμα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων εκτιμώντας την κυτταροτοξικότητα αυτών.



Εικόνα 4.1 Γραφική απεικόνιση της δημιουργίας hPSC-SMC υπότυπων και 3D αγγειακών οργανοειδών. Αναπτύχθηκε μια σύντομη μέθοδος για τη δημιουργία τόσο cSMC όσο και sSMC από hPSC. Σύμφωνα με αυτή, ο συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης ορού και η επακόλουθη καλλιέργεια των κυττάρων σε υπόστρωμα ζελατίνης, οδήγησε στη δημιουργία άωρων cSMC (υψηλή έκφραση αSMA, Calponin, SM22 και παρουσία SMMHC). Ο φαινότυπος αυτός παρέμενε σταθερός για τουλάχιστον 8 γεννεές. Η σύντομη επαγωγή με TGFβ1 και ηπαρίνη προκάλεσε ωρίμανση των cSMC, όπως φαίνεται από την αυξημένη έκφραση του SMMHC. Αντιθέτως, η βραχυπρόθεσμη έκθεση των άωρων cSMC σε FGF2 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των αSMA, Calponin και SM22α, την ανάπτυξη δηλαδή των sSMC. Η συγκαλλιέργεια των cSMC και sSMC υπότυπων με EC σε 3D σφαιροειδή (αγγειακά οργανοειδή), διατηρήρησε τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Τα οργανοειδή αυτά αποτέλεσαν εστίες εκκίνησης εκθλαστήσεων *in vitro*, ενώ η εμφύτευσή τους *in vivo* οδήγησε σε ταχεία δημιουργία ενός σύνθετου και λειτουργικού αγγειακού δικτύου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Αναγεννητική Ιατρική αναπτύσσει κυτταρικές θεραπείες χρησιμοποιώντας την αναγεννητική ικανότητα των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (hESC) και των επαναπρογραμματισμένων ισοδυνάμων τους (hiPSC). Αυτό το επιτυγχάνει με τη βοήθεια της μηχανικής ιστών δημιουργώντας βέλτιστα μικροπεριβάλλοντα για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και τη δημιουργία εμφυτεύσιμων ιστικών κατασκευών με τη σωστή χωροταξική οργάνωση.

Η διαθεσιμότητα αιμοφόρων αγγείων αποτελεί μια σημαντική απαίτηση για τη βιωσιμότητα και τη λειτουργία της εμφυτεύσιμης ιστικής κατασκευής υποστηρίζοντας την *in vivo* ανάπτυξή της. Η αναγέννηση ιστού άνω των 100-200μm υπερβαίνει την ικανότητα παροχής θρεπτικών ουσιών και απομάκρυνσης απορριμμάτων με διάχυση και απαιτεί τη δημιουργία αγγειακού δικτύου. Δυστυχώς, η αγγείωση του εμφυτεύματος από τον ξενιστή είναι μια αργή διαδικασία που οδηγεί σε χαμηλή βιωσιμότητά του. Έτσι, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων διαφοροποίησης των hESC σε αγγειακά κύτταρα με στόχο τη δημιουργία αγγειωμένων κατασκευών, ώστε να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την αγγείωση του εμφυτεύματος, προάγοντας την επιβίωση του.

Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε ένα πρωτόκολλο διαφοροποίησης των hESC σε EPC (Endothelial Progenitor Cells) [234], όπου στο πρώτο στάδιο γίνεται επαγωγή προς μεσόδερμα και στο δεύτερο, το οποίο εξαρτάται αποκλειστικά από τη δράση του VEGF, γίνεται η δέσμευση προς EPC. Στα πλαίσια αυτά, αναγνωρίσαμε και ταυτοποιήσαμε τον μεσοδερματικό υποπληθυσμό που είναι στόχος του VEGF και οδηγεί στη δημιουργία των EPC.

Επίσης, για το σκοπό αυτό, αναπτύξαμε μια απλή, αποτελεσματική και ταχεία *in vitro* προσέγγιση, όπου απουσία τροφοδοτικών κυττάρων και σε χαμηλή περιεκτικότητα ορού, προκαλέσαμε τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων-hPSC (hESC και hiPSC) σε διακριτούς πληθυσμούς SMC (συσταλτικά και συνθετικά hPSC-SMC). Οι πληθυσμοί αυτοί χαρακτηρίστηκαν εκτενώς ως προς το φαινότυπό τους (έκφραση των δεικτών CD44, CD73, CD105, NG2, PDGFRβ και των συσταλτικών πρωτεϊνών) και τις λειτουργίες τους ως hPSC-SMC. Ήταν φαινοτυπικά και λειτουργικά σταθεροί για τουλάχιστον 8 γεννεές

και μπορούσαν να ενσωματωθούν, να σταθεροποιηθούν και να αναστείλλουν την υποστροφή του αγγειακού δικτύου, κατά τη συγκαλλιέργια με EC *in vitro*.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα με βάση τη μεθυλοκυτταρίνη, δημιουργήσαμε 3D σφαιροειδή αποτελούμενα από EC/hPSC-SMC (αγγειακά οργανοειδή), τα οποία χαρακτηρίστηκαν εκτενώς φαινοτυπικά. Επιπλέον, τα αγγειακά οργανοειδή λειτούργησαν ως σημεία εκκίνησης εκβλαστήσεων τριχοειδών *in vitro*, ενώ η εμφύτευσή τους *in vivo* οδήγησε στην ταχεία δημιουργία ενός σύνθετου λειτουργικού αγγειακού δικτύου. Τέλος, διερευνήσαμε το αγγειογενετικό δυναμικό αυτών των αγγειακών οργανοειδών κατά την ενσωμάτωσή τους σε υδρογέλες αποτελούμενες από καθορισμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο / ινωδογόνο / φιβρονεκτίνη), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίσματα σε εφαρμογές στον τομέα της μηχανικής των ιστών.

SUMMARY

Regenerative Medicine develops cell therapies using the regenerative capacity of human embryonic stem cells (hESC) and their reprogrammed equivalents (hiPSC). It achieves this with the help of tissue engineering by creating optimal microenvironments for the growth and differentiation of stem cells and the creation of implantable tissue structures with the correct spatial organization.

The availability of blood vessels is an important requirement for the viability and function of the implantable tissue structure supporting its *in vivo* development. Tissue regeneration above 100-200µm exceeds the ability to provide nutrients and remove waste by diffusion and requires the creation of a vascular network. Unfortunately, the host's neovascularisation of the implant is a slow process that leads to its low viability. Thus, there is great interest in creating a vascular differentiation protocol for hESC structures to reduce the time required for vascularity and implant survival.

Initially we used a protocol for differentiation of hESC in EPC (Endothelial Progenitor Cells) [234], where initially induction is done to mesoderm and in a second stage, which depends exclusively on the action of VEGF, commitment to EPC takes place. In this context, we identified the intradermal subpopulation that is a target of the VEGF and leads to the creation of EPC.

To this end, we developed a simple, effective and rapid *in vitro* approach, where in the absence of feeder cells and low serum content, we caused the differentiation of human pluripotent stem cells-hPSC (hESC and hiPSC) into distinct populations and SMC (contractile and synthetic hPSC-SMC). These populations were extensively characterized by their phenotype (expression of CD44, CD73, CD105, NG2, PDGFRβ markers and contractile proteins) and their functions as hPSC-SMC. They were phenotypically and functionally stable for at least 8 generations and could integrate, stabilize and inhibit vascular network regression during co-culture with EC *in vitro*.

Next, using a methylcellulose-based system, we created 3D spheroids consisting of EC/hPSC-SMC (vascular organoids), which were extensively phenotypically characterized. In addition, vascular organs functioned as starting points for capillary germination *in vitro*, and their *in vivo* implantation led to the rapid

formation of a complex functional vascular network. Finally, we investigated the angiogenic potential of these vascular organelles during their incorporation into hydrogels consisting of defined components of the extracellular substance (collagen / fibrinogen / fibronectin), which can be used as scaffolds in its field applications.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A

ANG-1: Angiopoietin 1

α SMA: alpha smooth muscle actin

B

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

BSA: Bovine Serum Albumin

C

cSMC: contractile Smooth muscle Cells

c-Myc: c-Myelocytomatosis

D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

2D: 2 Dimensional

3D: 3 Dimensional

E

EB: Embryoid Bodies

EC: Endothelial cells

ECGS: Endothelial cell growth supplement

ECL: Enhanced Chemi luminescence

ECM: Extracellular Matrix

EGF: Epidermal growth factor

EPC: Endothelial Progenitor Cells

ESC: Embryonic Stem Cells

ERK1 /2: Extracellular-signal-Regulated Kinase-1/2

F

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBS: Fetal Bovine Serum

FGF: Fibroblast Growth Factor

G

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

H

hESC: human Embryonic Stem Cells

HIF: Hypoxia-Inducible Factor

hiPSC: human induced Pluripotent Stem Cells

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

hPSC: human Pluripotent Stam Cells

HSPC: Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

HSPGs: Heparin Surphate Proteoglycans

HSP27: Heat-Shock Protein-27

HRP: Horse Radish Peroxidase

I

IGF-I: Insulin-like growth factor-I

iPSC: induced Pluripotent Stem Cells

K

KLF4: Kruppel-like factor 4

L

LIMK1: LIM- kinase 1

M

MAPK: Mitogen- Activated Protein Kinase

MC: Mural Cells

MMPs: Metalloproteinases

MSC: Mesenchymal Stem Cells

MVSC: Multipotent vascular Stem Cells

N

NG2: Neural/Glial anti-gen 2

NRARP: NOTCH-Regulated Ankyrin Repeat Protein

NRPs: Neuropilins

N-cadherin: Neural cadherin

O

OCT: Optimal cutting temperature

Oct4/3: Octamer-binding transcription factor 4/3

P

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBS: Phosphate buffer saline

PC: Pericytes

PDGFB: Platelet-Derived Growth Factor B

PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PIGF: Placental Growth Factor

PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

PMSF: Phenyl Methane Sulphonyl Fluoride

PSC: Pluripotent Stem Cells

Q

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

R

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

S

SC: Stem Cells

SMC: Smooth Muscle Cells

SMMHC: Smooth Muscle Myosin Heavy Chain

SM22 α : Smooth Muscle protein 22-alpha

SOX2: SRY (sex determining region Y) -Box Transcription Factor 2

sSMC: synthetic Smooth Muscle Cells

S1P: Spingosine 1 Phosphate

T

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor ReceptorA

ve-cadherin: vascular endothelial-cadherin

vSMC: vascular Smooth Muscle Cells

A

AI: Αναγεννητική Ιατρική

K

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

M

MI: Μηχανική των Ιστών

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] A. Heidary Rouchi and M. Mahdavi-Mazdeh, “Regenerative medicine in organ and tissue transplantation: Shortly and practically achievable?,” *International Journal of Organ Transplantation Medicine*. 2015.
- [2] A. S. Mao and D. J. Mooney, “Regenerative medicine: Current therapies and future directions,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, doi: 10.1073/pnas.1508520112.
- [3] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *Journal of the Royal Society Interface*. 2006, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [4] C. Li, S. Chen, Y. Zhou, Y. Zhao, P. Liu, and J. Cai, “Application of induced pluripotent stem cell transplants: Autologous or allogeneic?,” *Life Sciences*. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.057.
- [5] C. Jensen and Y. Teng, “Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?,” *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [6] P. Carmeliet and R. K. Jain, “Angiogenesis in cancer and other diseases,” *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 249–257, 2000, doi: 10.1038/35025220.
- [7] R. K. Jain, “Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy,” *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5706, pp. 58–62, 2005, doi: 10.1126/science.1104819.
- [8] S. T. Nillesen, P. J. Geutjes, R. Wismans, J. Schalkwijk, W. F. Daamen, and T. H. van Kuppevelt, “Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1123–1131, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.029.
- [9] S. H. VANDER A, Sherman J, Luciano D, Widmaier E, Raff H, *Human Physiology: The Mechanism of Body Function, 8th Edition*. 2001.
- [10] M. Reiterer and C. M. Branco, “Endothelial cells and organ function: applications and implications of understanding unique and reciprocal remodelling,” *FEBS J.*, 2020, doi: 10.1111/febs.15143.
- [11] R. K. Jain, “Molecular regulation of vessel maturation,” *Nature Medicine*. 2003, doi: 10.1038/nm0603-685.
- [12] J. S. Pober and W. C. Sessa, “Evolving functions of endothelial cells in inflammation,” *Nature Reviews Immunology*. 2007, doi: 10.1038/nri2171.
- [13] J. M. Butler, H. Kobayashi, and S. Rafii, “Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors,” *Nature Reviews Cancer*. 2010, doi: 10.1038/nrc2791.
- [14] A. M. Müller, M. I. Hermanns, C. Skrzynski, M. Nesslinger, K. M. Müller, and C. J. Kirkpatrick, “Expression of the endothelial markers CD, vWF, and CD34 in Vivo and in Vitro,” *Exp. Mol. Pathol.*, 2002, doi: 10.1006/exmp.2002.2424.
- [15] M. Giannotta, M. Trani, and E. Dejana, “VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity,” *Developmental Cell*. 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.

- [16] M. J. Siemerink, I. Klaassen, I. M. C. Vogels, A. W. Griffioen, C. J. F. Van Noorden, and R. O. Schlingemann, "CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures," *Angiogenesis*, 2012, doi: 10.1007/s10456-011-9251-z.
- [17] D. B. AbuSamra *et al.*, "Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44," *Blood Adv.*, 2017, doi: 10.1182/bloodadvances.2017004317.
- [18] J. S. Schechner *et al.*, "In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 16, pp. 9191–9196, 2000, doi: 10.1073/pnas.150242297.
- [19] R. K. Jain, P. Au, J. Tam, D. G. Duda, and D. Fukumura, "Engineering vascularized tissue," *Nat Biotechnol*, vol. 23, no. 7, pp. 821–823, 2005, doi: 10.1038/nbt0705-821.
- [20] P. Au *et al.*, "Paradoxical effects of PDGF-BB overexpression in endothelial cells on engineered blood vessels in vivo," *Am J Pathol*, vol. 175, no. 1, pp. 294–302, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080887.
- [21] H. Hashizume *et al.*, "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness," *Am J Pathol*, vol. 156, no. 4, pp. 1363–1380, 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7.
- [22] J. M. Melero-Martin *et al.*, "Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells," *Circ Res*, vol. 103, no. 2, pp. 194–202, 2008, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178590.
- [23] D. Shepro and N. M. Morel, "Pericyte physiology," *FASEB J*, vol. 7, no. 11, pp. 1031–1038, 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370472>.
- [24] D. A. Chistiakov, A. N. Orekhov, and Y. V Bobryshev, "Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis," *Acta Physiol*, vol. 214, no. 1, pp. 33–50, 2015, doi: 10.1111/apha.12466.
- [25] A. Holm, T. Heumann, and H. G. Augustin, "Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity," *Trends Cell Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 302–316, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.12.002>.
- [26] A. Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, "Endothelial/pericyte interactions," *Circ Res*, vol. 97, no. 6, pp. 512–523, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- [27] J. N. Regan and M. W. Majesky, "Building a vessel wall with notch signaling," *Circ Res*, vol. 104, no. 4, pp. 419–421, 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.194233.
- [28] S. Trkov, G. Eng, R. Di Liddo, P. P. Parnigotto, and G. Vunjak-Novakovic, "Micropatterned three-dimensional hydrogel system to study human endothelial-mesenchymal stem cell interactions," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 4, no. 3, pp. 205–215, 2010, doi: 10.1002/term.231.
- [29] A. Dar and J. Itskovitz-Eldor, "Therapeutic potential of perivascular cells from human pluripotent stem cells," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2015, doi: 10.1002/term.1698.
- [30] L. Diaz-Flores *et al.*, "Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche," *Histol Histopathol*, vol. 24, no. 7, pp. 909–969, 2009, [Online]. Available:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475537>.
- [31] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz, "Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises," *Dev Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 193–215, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.
- [32] D. A. Hartmann, R. G. Underly, R. I. Grant, A. N. Watson, V. Lindner, and A. Y. Shih, "Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice," *Neurophotonics*, 2015, doi: 10.1117/1.nph.2.4.041402.
- [33] S. G. Ball, C. A. Shuttleworth, and C. M. Kielty, "Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: Implications for neovascularization," *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010, doi: 10.1517/14712590903379510.
- [34] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease," *Physiol Rev*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, 2004, doi: 10.1152/physrev.00041.2003.
- [35] J. A. Beamish, P. He, K. Kottke-Marchant, and R. E. Marchant, "Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 16, no. 5, pp. 467–491, 2010, doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0630.
- [36] M. Aikawa *et al.*, "Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis," *Circ. Res.*, 1993, doi: 10.1161/01.RES.73.6.1000.
- [37] M. Yamamoto, K. Yamamoto, and T. Noumura, "Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype," *Exp. Cell Res.*, 1993, doi: 10.1006/excr.1993.1016.
- [38] S. K. Karnik *et al.*, "A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease," *Development*. 2003, doi: 10.1242/dev.00223.
- [39] A. Cecchetti, S. Rocchiccioli, C. Boccardi, and L. Citti, "Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view," *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 288, pp. 43–99, 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-386041-5.00002-9.
- [40] A. Cho and M. A. Reidy, "Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury," *Circ. Res.*, 2002, doi: 10.1161/01.RES.0000040420.17366.2E.
- [41] M. Wanjare, S. Kusuma, and S. Gerecht, "Perivascular cells in blood vessel regeneration," *Biotechnol J*, vol. 8, no. 4, pp. 434–447, 2013, doi: 10.1002/biot.201200199.
- [42] M. Wanjare, S. Kusuma, and S. Gerecht, "Perivascular cells in blood vessel regeneration," *Biotechnology Journal*. 2013, doi: 10.1002/biot.201200199.
- [43] B. Gökçinar-Yagci, D. Uçkan-Çetinkaya, and B. Çelebi-Saltik, "Pericytes: Properties, functions and applications in tissue engineering," *Stem Cell Rev. Reports*, 2015, doi: 10.1007/s12015-015-9590-z.
- [44] S. Mills, A. Cowin, and P. Kaur, "Pericytes, Mesenchymal Stem Cells and the Wound Healing Process," *Cells*, 2013, doi: 10.3390/cells2030621.

- [45] F. Pfister, E. Przybyt, M. C. Harmsen, and H. P. Hammes, "Pericytes in the eye," *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2013, doi: 10.1007/s00424-013-1272-6.
- [46] U. Tigges, J. V Welsler-Alves, A. Boroujerdi, and R. Milner, "A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain," *Microvasc Res*, vol. 84, no. 1, pp. 74–80, 2012, doi: 10.1016/j.mvr.2012.03.008.
- [47] C. G. M. Van Dijk *et al.*, "The complex mural cell: Pericyte function in health and disease," *International Journal of Cardiology*. 2015, doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.258.
- [48] M. Crisan *et al.*, "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 301–313, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- [49] D. T. Covas *et al.*, "Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts," *Exp Hematol*, vol. 36, no. 5, pp. 642–654, 2008, doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.015.
- [50] V. Nehls and D. Drenckhahn, "The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle?," *Histochemistry*, vol. 99, no. 1, pp. 1–12, 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8468190>.
- [51] C. Sundberg, M. Ivarsson, B. Gerdin, and K. Rubin, "Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring," *Lab. Investig.*, 1996.
- [52] M. Crisan, C. W. Chen, M. Corselli, G. Andriolo, L. Lazzari, and B. Péault, "Perivascular multipotent progenitor cells in human organs," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04967.x.
- [53] T. S. Park *et al.*, "Placental perivascular cells for human muscle regeneration," *Stem Cells Dev.*, 2011, doi: 10.1089/scd.2010.0354.
- [54] W. Cathery, A. Faulkner, D. Maselli, and P. Madeddu, "Concise Review: The Regenerative Journey of Pericytes Toward Clinical Translation," *Stem Cells*, vol. 36, no. 9, pp. 1295–1310, 2018, doi: 10.1002/stem.2846.
- [55] A. Dar and J. Itskovitz-Eldor, "Therapeutic potential of perivascular cells from human pluripotent stem cells," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 9, no. 9, pp. 977–987, 2015, doi: 10.1002/term.1698.
- [56] S. B. H. Timraz, I. A. H. Farhat, G. Alhussein, N. Christoforou, and J. C. M. Teo, "In-depth evaluation of commercially available human vascular smooth muscle cells phenotype: Implications for vascular tissue engineering," *Exp. Cell Res.*, 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.04.004.
- [57] J. Yamashita *et al.*, "Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors," *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 92–96, 2000, doi: 10.1038/35040568.
- [58] S. M. Müller *et al.*, "Neural Crest Origin of Perivascular Mesenchyme in the Adult Thymus," *J. Immunol.*, 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5344.
- [59] A. Trost *et al.*, "Neural crest origin of retinal and choroidal pericytes," *Investig.*

- Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013, doi: 10.1167/iovs.13-12946.
- [60] J. Que, B. Wilm, H. Hasegawa, F. Wang, D. Bader, and B. L. M. Hogan, "Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, doi: 10.1073/pnas.0808649105.
- [61] B. Wilm, A. Ipenberg, N. D. Hastie, J. B. E. Burch, and D. M. Bader, "The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature," *Development*, 2005, doi: 10.1242/dev.02141.
- [62] K. Asahina, B. Zhou, W. T. Pu, and H. Tsukamoto, "Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver," *Hepatology*, 2011, doi: 10.1002/hep.24119.
- [63] K. S. Volz *et al.*, "Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle," *Elife*, 2015, doi: 10.7554/eLife.10036.
- [64] M. W. Majesky, X. R. Dong, J. N. Regan, and V. J. Hoglund, "Vascular smooth muscle progenitor cells: Building and repairing blood vessels," *Circulation Research*. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223800.
- [65] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [66] M. C. Vemuri, L. G. Chase, and M. S. Rao, "Mesenchymal stem cell assays and applications.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-999-4_1.
- [67] W. Risau, "Mechanisms of angiogenesis," *Nature*, vol. 386, no. 6626, pp. 671–674, 1997, doi: 10.1038/386671a0.
- [68] W. Risau, "Differentiation of endothelium," *FASEB J*, vol. 9, no. 10, pp. 926–933, 1995, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615161>.
- [69] A. Schmidt, K. Brixius, and W. Bloch, "Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis," *Circ Res*, vol. 101, no. 2, pp. 125–136, 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.148932.
- [70] J. Folkman, "Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview," *EXS*, vol. 79, pp. 1–8, 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002217>.
- [71] A. S. Chung, J. Lee, and N. Ferrara, "Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis," *Nature Reviews Cancer*. 2010, doi: 10.1038/nrc2868.
- [72] P. Carmeliet, "Angiogenesis in health and disease," *Nature Medicine*. 2003, doi: 10.1038/nm0603-653.
- [73] T. Asahara *et al.*, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science (80-.)*, 1997, doi: 10.1126/science.275.5302.964.
- [74] D. Lyden *et al.*, "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth," *Nat. Med.*, 2001, doi: 10.1038/nm1101-1194.
- [75] D. J. Nolan *et al.*, "Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major

- determinant of nascent tumor neovascularization," *Genes Dev.*, 2007, doi: 10.1101/gad.436307.
- [76] M. De Palma, M. A. Venneri, C. Roca, and L. Naldini, "Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells," *Nat. Med.*, 2003, doi: 10.1038/nm871.
- [77] Y. Okuno, A. Nakamura-Ishizu, K. Kishi, T. Suda, and Y. Kubota, "Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing," *Blood*, 2011, doi: 10.1182/blood-2011-01-330720.
- [78] J. L. Haar and G. A. Ackerman, "A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse," *Anat Rec*, vol. 170, no. 2, pp. 199–223, 1971, doi: 10.1002/ar.1091700206.
- [79] I. Flamme, T. Frolich, and W. Risau, "Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis," *J Cell Physiol*, vol. 173, no. 2, pp. 206–210, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<206::AID-JCP22>3.0.CO;2-C.
- [80] P. H. Burri and M. R. Tarek, "A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation," *Anat. Rec.*, 1990, doi: 10.1002/ar.1092280107.
- [81] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*. 2011, doi: 10.1038/nature10144.
- [82] V. Djonov, O. Baum, and P. H. Burri, "Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis," *Cell and Tissue Research*. 2003, doi: 10.1007/s00441-003-0784-3.
- [83] H. Kurz, P. H. Burri, and V. G. Djonov, "Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function," *News in Physiological Sciences*. 2003, doi: 10.1152/nips.01417.2002.
- [84] V. G. Djonov, H. Kurz, and P. H. Burri, "Optimality in the developing vascular system: Branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism," *Dev. Dyn.*, 2002, doi: 10.1002/dvdy.10119.
- [85] S. P. Herbert and D. Y. R. Stainier, "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011, doi: 10.1038/nrm3176.
- [86] K. Gaengel, G. Genové, A. Armulik, and C. Betsholtz, "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161521.
- [87] P. Lindahl, B. R. Johansson, P. Levéen, and C. Betsholtz, "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice," *Science (80-)*, 1997, doi: 10.1126/science.277.5323.242.
- [88] P. Lindblom *et al.*, "Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall," *Genes Dev.*, 2003, doi: 10.1101/gad.266803.
- [89] Y. Liu *et al.*, "Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation," *J. Clin. Invest.*, 2000, doi: 10.1172/JCI10905.
- [90] M. L. Allende, T. Yamashita, and R. L. Proia, "G-protein-coupled receptor S1P1 acts

- within endothelial cells to regulate vascular maturation," *Blood*, 2003, doi: 10.1182/blood-2003-02-0460.
- [91] J. H. Paik *et al.*, "Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization," *Genes Dev.*, 2004, doi: 10.1101/gad.1227804.
- [92] C. Suri *et al.*, "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis," *Cell*, 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81813-9.
- [93] H. G. Augustin, G. Young Koh, G. Thurston, and K. Alitalo, "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, doi: 10.1038/nrm2639.
- [94] S. Chen and R. J. Lechleider, "Transforming growth factor- β -induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line," *Circ. Res.*, 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000126897.41658.81.
- [95] P. C. Maisonpierre *et al.*, "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science (80-.)*, 1997, doi: 10.1126/science.277.5322.55.
- [96] S. Ogawa, A. Oku, A. Sawano, S. Yamaguchi, Y. Yazaki, and M. Shibuya, "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain," *J. Biol. Chem.*, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.47.31273.
- [97] Y. Yamazaki, Y. Matsunaga, Y. Tokunaga, S. Obayashi, M. Saito, and T. Morita, "Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species," *J. Biol. Chem.*, 2009, doi: 10.1074/jbc.M809071200.
- [98] S. Iyer and K. R. Acharya, "Tying the knot: The cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines," *FEBS Journal*. 2011, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08350.x.
- [99] N. Ferrara, "Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for Anticancer Therapy," *Oncologist*, 2004, doi: 10.1634/theoncologist.9-suppl_1-2.
- [100] P. Carmeliet *et al.*, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature*, vol. 380, no. 6573, pp. 435–439, 1996, doi: 10.1038/380435a0.
- [101] S. Lee *et al.*, "Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis," *Cell*, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.054.
- [102] J. Plouët *et al.*, "Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect," *J. Biol. Chem.*, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.20.13390.
- [103] Z. Poltorak *et al.*, "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix," *J. Biol. Chem.*, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.11.7151.
- [104] J. Woolard, H. S. Bevan, S. J. Harper, and D. O. Bates, "Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity," *Microcirculation*. 2009, doi: 10.1080/10739680902997333.
- [105] F. Borriello, R. Tizard, E. Rue, and R. Reeves, "Characterization and localization of

- Mox2, the gene encoding the murine homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein," *Mamm. Genome*, 1998, doi: 10.1007/s003359900700.
- [106] K. A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D. W. Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of rna," *Mol. Endocrinol.*, 1991, doi: 10.1210/mend-5-12-1806.
- [107] G. Neufeld *et al.*, "Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants," *Cancer and Metastasis Reviews*. 1996, doi: 10.1007/BF00437467.
- [108] G. Neufeld, S. Tessler, H. Gitay-Goren, T. Cohen, and B. Z. Levi, "Vascular endothelial growth factor and its receptors," *Prog. Growth Factor Res.*, 1994, doi: 10.1016/0955-2235(94)90019-1.
- [109] B. Olofsson, K. Pajusola, G. Von Euler, D. Chilov, K. Alitalo, and U. Eriksson, "Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform," *J. Biol. Chem.*, 1996, doi: 10.1074/jbc.271.32.19310.
- [110] D. Maglione *et al.*, "Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14," *Oncogene*, 1993.
- [111] K. Alitalo, T. Tammela, and T. V. Petrova, "Lymphangiogenesis in development and human disease," *Nature*. 2005, doi: 10.1038/nature04480.
- [112] D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet, "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis," *Nature*, 1992, doi: 10.1038/359843a0.
- [113] N. Ferrara, H. P. Gerber, and J. LeCouter, "The biology of VEGF and its receptors," *Nature Medicine*. 2003, doi: 10.1038/nm0603-669.
- [114] N. Kabrun, H. J. Bühring, K. Choi, A. Ullrich, W. Risau, and G. Keller, "Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors," *Development*, 1997.
- [115] A. N. Witmer, J. Dai, H. A. Weich, G. F. J. M. Vrensen, and R. O. Schlingemann, "Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia," *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, doi: 10.1177/002215540205000603.
- [116] M. Errico *et al.*, "Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor," *J. Biol. Chem.*, 2004, doi: 10.1074/jbc.M401418200.
- [117] B. Olofsson *et al.*, "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.20.11709.
- [118] D. J. Lyttle, K. M. Fraser, S. B. Fleming, A. A. Mercer, and A. J. Robinson, "Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus," *J. Virol.*, 1994, doi: 10.1128/jvi.68.1.84-92.1994.
- [119] M. Simons, E. Gordon, and L. Claesson-Welsh, "Mechanisms and regulation of

- endothelial VEGF receptor signalling,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016, doi: 10.1038/nrm.2016.87.
- [120] S. Hiratsuka, K. Nakao, K. Nakamura, M. Katsuki, Y. Maru, and M. Shibuya, “Membrane Fixation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Ligand-Binding Domain Is Important for Vasculogenesis and Angiogenesis in Mice,” *Mol. Cell. Biol.*, 2005, doi: 10.1128/mcb.25.1.346-354.2005.
- [121] M. Shibuya, “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies,” *Genes and Cancer*, 2011, doi: 10.1177/1947601911423031.
- [122] R. D. Meyer, M. Mohammadi, and N. Rahimi, “A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1,” *J. Biol. Chem.*, 2006, doi: 10.1074/jbc.M506454200.
- [123] J. Waltenberger, L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C. H. Heldin, “Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor,” *J. Biol. Chem.*, 1994.
- [124] G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, and M. L. Breitman, “Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium,” *Nature*. 1995, doi: 10.1038/376066a0.
- [125] F. Shalaby *et al.*, “Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice,” *Nature*. 1995, doi: 10.1038/376062a0.
- [126] G. Neufeld, O. Kessler, and Y. Herzog, “The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002, doi: 10.1007/978-1-4615-0119-0_7.
- [127] G. Neufeld, T. Cohen, N. Shraga, T. Lange, O. Kessler, and Y. Herzog, “The neuropilins: Multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis,” *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2002, doi: 10.1016/S1050-1738(01)00140-2.
- [128] T. Kitsukawa *et al.*, “Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice,” *Neuron*, 1997, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80392-X.
- [129] H. Chen, A. Chédotal, Z. He, C. S. Goodman, and M. Tessier-Lavigne, “Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III,” *Neuron*, 1997, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80371-2.
- [130] B. Favier *et al.*, “Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration,” *Blood*, 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4447.
- [131] T. Kitsukawa, A. Shimono, A. Kawakami, H. Kondoh, and H. Fujisawa, “Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs,” *Development*, 1995.
- [132] F. S. Grünewald, A. E. Prota, A. Giese, and K. Ballmer-Hofer, “Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic

- signaling," *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.002.
- [133] T. Cohen *et al.*, "VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human f melanoma cells," *J. Biol. Chem.*, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.19.11322.
- [134] L. Jakobsson *et al.*, "Heparan Sulfate in trans Potentiates VEGFR-Mediated Angiogenesis," *Dev. Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.devcel.2006.03.009.
- [135] T. Takahashi, S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya, "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells," *EMBO J.*, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.11.2768.
- [136] L. Lamalice, F. Houle, G. Jourdan, and J. Huot, "Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38," *Oncogene*, 2004, doi: 10.1038/sj.onc.1207034.
- [137] S. Rousseau, F. Houle, J. Landry, and J. Huot, "P38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells," *Oncogene*, 1997, doi: 10.1038/sj.onc.1201380.
- [138] M. Kobayashi, M. Nishita, T. Mishima, K. Ohashi, and K. Mizuno, "MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration," *EMBO J.*, 2006, doi: 10.1038/sj.emboj.7600973.
- [139] S. Patel-Hett and P. A. D'Amore, "Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis," *Int J Dev Biol*, vol. 55, no. 4–5, pp. 353–363, 2011, doi: 10.1387/ijdb.103213sp.
- [140] E. Karali, S. Bellou, D. Stellas, A. Klinakis, C. Murphy, and T. Fotsis, "VEGF Signals through ATF6 and PERK to Promote Endothelial Cell Survival and Angiogenesis in the Absence of ER Stress," *Mol. Cell*, 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.022.
- [141] "OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Introduction," *Am. J. Transplant.*, 2017, doi: 10.1111/ajt.14123.
- [142] P. Chatterjee, A. S. Venkataramani, A. Vijayan, J. R. Wellen, and E. G. Martin, "The effect of state policies on organ donation and transplantation in the United States," in *JAMA Internal Medicine*, 2015, doi: 10.1001/jamainternmed.2015.2194.
- [143] F. L. Delmonico, B. Domínguez-Gil, R. Matesanz, and L. Noel, "A call for government accountability to achieve national self-sufficiency in organ donation and transplantation," *The Lancet*. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61486-4.
- [144] S. Min, I. K. Ko, and J. J. Yoo, "State-of-the-art strategies for the vascularization of three-dimensional engineered organs," *Vascular Specialist International*. 2019, doi: 10.5758/vsi.2019.35.2.77.
- [145] J. Rouwkema and A. Khademhosseini, "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks," *Trends in Biotechnology*. 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.

- [146] S. Al-Himdani *et al.*, “Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice,” *Frontiers in Surgery*. 2017, doi: 10.3389/fsurg.2017.00004.
- [147] C. A. Staton, M. W. R. Reed, and N. J. Brown, “A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays,” *International Journal of Experimental Pathology*. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x.
- [148] P. Chandra and A. Atala, “Engineering blood vessels and vascularized tissues: Technology trends and potential clinical applications,” *Clinical Science*. 2019, doi: 10.1042/CS20180155.
- [149] G. Kolios and Y. Moodley, “Introduction to stem cells and regenerative medicine,” *Respiration*. 2012, doi: 10.1159/000345615.
- [150] P. H. Lerou and G. Q. Daley, “Therapeutic potential of embryonic stem cells,” *Blood Rev.*, 2005, doi: 10.1016/j.blre.2005.01.005.
- [151] E. Fuchs and J. A. Segre, “Stem cells: A new lease on life,” *Cell*. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81691-8.
- [152] P. A. Zuk *et al.*, “Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies,” in *Tissue Engineering*, 2001, doi: 10.1089/107632701300062859.
- [153] X. Wei, X. Yang, Z. P. Han, F. F. Qu, L. Shao, and Y. F. Shi, “Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy,” *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013, doi: 10.1038/aps.2013.50.
- [154] U. Bissels, Y. Diener, D. Eckardt, and A. Bosio, “Characterization and classification of stem cells,” in *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient: 2. Stem Cell Science and Technology: Third Edition*, 2016.
- [155] L. Bacakova *et al.*, “Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review,” *Biotechnology Advances*. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
- [156] J. A. Thomson *et al.*, “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts,” *Science (80-.)*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>.
- [157] S. Mitalipov and D. Wolf, “Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming,” *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 114, pp. 185–199, 2009, doi: 10.1007/10_2008_45.
- [158] J. Galipeau and L. Sensébé, “Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities,” *Cell Stem Cell*. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
- [159] D. Sipp, P. G. Robey, and L. Turner, “Clear up this stem-cell mess,” *Nature*. 2018, doi: 10.1038/d41586-018-06756-9.
- [160] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda, “Human autologous culture expanded bone marrow-mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees,” *Osteoarthr. Cartil.*, 2002, doi: 10.1053/joca.2001.0504.
- [161] A. C. Hinken and A. N. Billin, “Isolation of skeletal muscle stem cells for phenotypic

- screens for modulators of proliferation,” in *Methods in Molecular Biology*, 2018.
- [162] N. Ojeh, I. Pastar, M. Tomic-Canic, and O. Stojadinovic, “Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, doi: 10.3390/ijms161025476.
- [163] J. Willemse, R. Lieshout, L. J. W. van der Laan, and M. M. A. Versteegen, “From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix,” *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2017, doi: 10.1016/j.bpg.2017.03.003.
- [164] J. Zhang *et al.*, “Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy,” *Cell Tissue Res.*, 2016, doi: 10.1007/s00441-016-2402-1.
- [165] C. Klopsch *et al.*, “Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart,” *Eur. Surg. Res.*, 2017, doi: 10.1159/000480730.
- [166] D. A. G. Barisas and T. S. Stappenbeck, “Intestinal Stem Cells Live Off the Fat of the Land,” *Cell Stem Cell*. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.04.018.
- [167] I. Ullah, R. B. Subbarao, and G. J. Rho, “Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective,” *Bioscience Reports*. 2015, doi: 10.1042/BSR20150025.
- [168] U. Ben-David and N. Benvenisty, “The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells,” *Nature Reviews Cancer*. 2011, doi: 10.1038/nrc3034.
- [169] K. O’Donoghue and N. M. Fisk, “Fetal stem cells,” *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2004, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010.
- [170] V. Volarevic *et al.*, “Ethical and safety issues of stem cell-based therapy,” *International Journal of Medical Sciences*. 2018, doi: 10.7150/ijms.21666.
- [171] K. Takahashi and S. Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,” *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [172] H. Zaehres and H. R. Schöler, “Induction of Pluripotency: From Mouse to Human,” *Cell*. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.020.
- [173] K. Takahashi *et al.*, “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors,” *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [174] M. Nakagawa *et al.*, “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts,” *Nat. Biotechnol.*, 2008, doi: 10.1038/nbt1374.
- [175] J. Bilic and J. C. Izpisua Belmonte, “Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart?,” *Stem Cells*. 2012, doi: 10.1002/stem.700.
- [176] M. H. Chin *et al.*, “Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures,” *Cell Stem Cell*, 2009, doi: 10.1016/j.stem.2009.06.008.

- [177] C. Heffernan, H. Sumer, and P. J. Verma, "Generation of clinically relevant 'induced pluripotent stem' (iPS) cells," *Journal of Stem Cells*. 2011.
- [178] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, and S. Yamanaka, "Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress," *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.245.
- [179] N. Lenoir, "Europe confronts the embryonic stem cell research challenge," *Science*. 2000, doi: 10.1126/science.287.5457.1425.
- [180] K. Azuma and S. Yamanaka, "Recent policies that support clinical application of induced pluripotent stem cell-based regenerative therapies," *Regenerative Therapy*. 2016, doi: 10.1016/j.reth.2016.01.009.
- [181] A. S. Lee *et al.*, "Brief Report: External Beam Radiation Therapy for the Treatment of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Teratomas," *Stem Cells*, 2017, doi: 10.1002/stem.2653.
- [182] N. M. Kane, Q. Xiao, A. H. Baker, Z. Luo, Q. Xu, and C. Emanuelli, "Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular re(generation)," *Pharmacol Ther*, vol. 129, no. 1, pp. 29–49, 2011, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.10.004.
- [183] J. Itskovitz-Eldor *et al.*, "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers.," *Mol. Med.*, 2000, doi: 10.1007/BF03401776.
- [184] S. Levenberg, J. S. Golub, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, and R. Langer, "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 7, pp. 4391–4396, 2002, doi: 10.1073/pnas.032074999.
- [185] Z. Li *et al.*, "Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects," *Stem Cells*, vol. 26, no. 4, pp. 864–873, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0843.
- [186] S. W. Cho *et al.*, "Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia," *Circulation*, vol. 116, no. 21, pp. 2409–2419, 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.687038.
- [187] C. Q. Xie, J. Zhang, L. Villacorta, T. Cui, H. Huang, and Y. E. Chen, "A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 27, no. 12, pp. e311-2, 2007, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.154260.
- [188] Z. Z. Wang *et al.*, "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo," *Nat Biotechnol*, vol. 25, no. 3, pp. 317–318, 2007, doi: 10.1038/nbt1287.
- [189] K. L. Hill *et al.*, "Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function," *Exp Hematol*, vol. 38, no. 3, pp. 246-257 e1, 2010, doi: 10.1016/j.exphem.2010.01.001.
- [190] H. Lindskog, E. Athley, E. Larsson, S. Lundin, M. Hellstrom, and P. Lindahl, "New insights to vascular smooth muscle cell and pericyte differentiation of mouse

- embryonic stem cells in vitro," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 26, no. 7, pp. 1457–1464, 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000222925.49817.17.
- [191] M. Sone *et al.*, "Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells," *Circulation*, vol. 107, no. 16, pp. 2085–2088, 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000070022.78747.1B.
- [192] M. A. Vodyanik, J. A. Bork, J. A. Thomson, and Slukvin II, "Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential," *Blood*, vol. 105, no. 2, pp. 617–626, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-04-1649.
- [193] D. S. Kaufman, E. T. Hanson, R. L. Lewis, R. Auerbach, and J. A. Thomson, "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 19, pp. 10716–10721, 2001, doi: 10.1073/pnas.191362598.
- [194] P. M. Chiang and P. C. Wong, "Differentiation of an embryonic stem cell to hemogenic endothelium by defined factors: essential role of bone morphogenetic protein 4," *Development*, vol. 138, no. 13, pp. 2833–2843, 2011, doi: 10.1242/dev.061440.
- [195] L. Chicha, A. Feki, A. Boni, O. Irion, O. Hovatta, and M. Jaconi, "Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34- and CD34+ progenitors with distinct characteristics," *PLoS One*, vol. 6, no. 2, p. e14733, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0014733.
- [196] S. W. Park *et al.*, "Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of the MEK/ERK and BMP4 signaling pathways," *Blood*, vol. 116, no. 25, pp. 5762–5772, 2010, doi: 10.1182/blood-2010-04-280719.
- [197] Q. Xiao, L. Zeng, Z. Zhang, Y. Hu, and Q. Xu, "Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin alpha1/beta1/alpha v and PDGF receptor pathways," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 292, no. 1, pp. C342-52, 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00341.2006.
- [198] J. Yamashita *et al.*, "Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors," *Nature*, 2000, doi: 10.1038/35040568.
- [199] A. Kumar *et al.*, "Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts," *Cell Rep.*, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.019.
- [200] S. J. Hollister, "Porous scaffold design for tissue engineering," *Nature Materials*. 2005, doi: 10.1038/nmat1421.
- [201] B. S. Kim and D. J. Mooney, "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering," *Trends in Biotechnology*. 1998, doi: 10.1016/S0167-7799(98)01191-3.
- [202] M. P. Lutolf and J. A. Hubbell, "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering," *Nature Biotechnology*. 2005, doi: 10.1038/nbt1055.

- [203] A. B. Sanghvi, K. P. H. Miller, A. M. Belcher, and C. E. Schmidt, "Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer," *Nat. Mater.*, 2005, doi: 10.1038/nmat1397.
- [204] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nat. Biotechnol.*, 2016, doi: 10.1038/nbt.3413.
- [205] G. Mazza *et al.*, "Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation," *Sci. Rep.*, 2015, doi: 10.1038/srep13079.
- [206] J. L. Drury and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–4351, 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922147>.
- [207] P. A. Janmey, J. P. Winer, and J. W. Weisel, "Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications," *Journal of the Royal Society Interface*. 2009, doi: 10.1098/rsif.2008.0327.
- [208] F. M. Shaikh, A. Callanan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace, and T. M. McGloughlin, "Fibrin: A natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering," *Cells Tissues Organs*. 2008, doi: 10.1159/000139772.
- [209] W. D. Spotnitz, "Fibrin sealant: Past, present, and future: A brief review," *World Journal of Surgery*. 2010, doi: 10.1007/s00268-009-0252-7.
- [210] G. Benton, I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, and J. Koblinski, "Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2014.06.005.
- [211] C. S. Hughes, L. M. Postovit, and G. A. Lajoie, "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.," *Proteomics*, 2010, doi: 10.1002/pmic.200900758.
- [212] D. Yee, D. Hanjaya-Putra, V. Bose, E. Luong, and S. Gerecht, "Hyaluronic acid hydrogels support cord-like structures from endothelial colony-forming cells," *Tissue Eng. - Part A*, 2011, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0481.
- [213] G. M. Whitesides and B. Grzybowski, "Self-assembly at all scales," *Science*. 2002, doi: 10.1126/science.1070821.
- [214] N. De Souza, "Organoids," *Nature Methods*. 2018, doi: 10.1038/nmeth.4576.
- [215] M. Simian and M. J. Bissell, "Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions," *J. Cell Biol.*, 2017, doi: 10.1083/jcb.201610056.
- [216] K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov, R. R. Markwald, and G. Forgacs, "Engineering biological structures of prescribed shaped using self-assembling multicellular systems," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, doi: 10.1073/pnas.0400164101.
- [217] V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, and R. R. Markwald, "Organ printing: Tissue spheroids as building blocks," *Biomaterials*, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.084.
- [218] R. Derda *et al.*, "Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays," *Proc*

- Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 44, pp. 18457–18462, 2009, doi: 10.1073/pnas.0910666106.
- [219] S. H. Bhang *et al.*, “Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2734–2747, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.035.
- [220] L. B. Weiswald, D. Bellet, and V. Dangles-Marie, “Spherical Cancer Models in Tumor Biology,” *Neoplasia (United States)*. 2015, doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004.
- [221] M. E. Katt, A. L. Placone, A. D. Wong, Z. S. Xu, and P. C. Searson, “In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2016, doi: 10.3389/fbioe.2016.00012.
- [222] F. Pampaloni and E. H. K. Stelzer, “Three-dimensional cell cultures in toxicology,” *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2009, doi: 10.5661/bger-26-117.
- [223] C. R. Thoma, M. Zimmermann, I. Agarkova, J. M. Kelm, and W. Krek, “3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2014.03.001.
- [224] T. M. Achilli, J. Meyer, and J. R. Morgan, “Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids,” *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012, doi: 10.1517/14712598.2012.707181.
- [225] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, and J. De Boer, “Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues,” *Trends in Biotechnology*. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [226] H. H. Yoon, S. H. Bhang, J. Y. Shin, J. Shin, and B. S. Kim, “Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells,” *Tissue Eng. - Part A*, 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2011.0647.
- [227] C. Montani *et al.*, “Fibroblasts maintained in 3 dimensions show a better differentiation state and higher sensitivity to estrogens,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2014, doi: 10.1016/j.taap.2014.08.021.
- [228] H. Ota, T. Kodama, and N. Miki, “Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study,” *Biomicrofluidics*, 2011, doi: 10.1063/1.3609969.
- [229] S. Lopa *et al.*, “Fabrication of multi-well chips for spheroid cultures and implantable constructs through rapid prototyping techniques,” *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, doi: 10.1002/bit.25557.
- [230] T. Korff and H. G. Augustin, “Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation,” *J Cell Biol*, vol. 143, no. 5, pp. 1341–1352, 1998, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832561>.
- [231] T. Korff, T. Krauss, and H. G. Augustin, “Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies,” *Exp Cell Res*, vol. 297, no. 2, pp. 415–423, 2004, doi: 10.1016/j.yexcr.2004.03.043.
- [232] A. Alajati *et al.*, “Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice,” *Nat*

- Methods*, vol. 5, no. 5, pp. 439–445, 2008, doi: 10.1038/nmeth.1198.
- [233] D. Kouroupis *et al.*, “Generation of stem cell-based bioartificial anterior cruciate ligament (ACL) grafts for effective ACL rupture repair,” *Stem Cell Res*, vol. 17, no. 2, pp. 448–457, 2016, doi: 10.1016/j.scr.2016.04.016.
- [234] K. C. Tsois *et al.*, “Proteome changes during transition from human embryonic to vascular progenitor cells,” *J. Proteome Res.*, 2016, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00180.
- [235] E. S. Ng, R. Davis, E. G. Stanley, and A. G. Elefanty, “A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies,” *Nat Protoc*, vol. 3, no. 5, pp. 768–776, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.42.
- [236] E. A. Jones *et al.*, “Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells,” *Arthritis Rheum*, vol. 46, no. 12, pp. 3349–3360, 2002, doi: 10.1002/art.10696.
- [237] S. Y. Oh, J. Y. Kim, and C. Park, “The ETS factor, ETV2: A master regulator for vascular endothelial cell development,” *Molecules and Cells*. 2015, doi: 10.14348/molcells.2015.0331.
- [238] M. Wanjare, F. Kuo, and S. Gerecht, “Derivation and maturation of synthetic and contractile vascular smooth muscle cells from human pluripotent stem cells,” *Cardiovasc Res*, vol. 97, no. 2, pp. 321–330, 2013, doi: 10.1093/cvr/cvs315.
- [239] N. L. Boyd, K. R. Robbins, S. K. Dhara, F. D. West, and S. L. Stice, “Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells,” *Tissue Eng Part A*, vol. 15, no. 8, pp. 1897–1907, 2009, doi: 10.1089/ten.tea.2008.0351.
- [240] B. N. Davis, A. C. Hilyard, G. Lagna, and A. Hata, “SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation,” *Nature*, vol. 454, no. 7200, pp. 56–61, 2008, doi: 10.1038/nature07086.
- [241] C. L. Jackson and M. A. Reidy, “Basic fibroblast growth factor: Its role in the control of smooth muscle cell migration,” *Am. J. Pathol.*, 1993.
- [242] B. J. Holycross, R. S. Blank, M. M. Thompson, M. J. Peach, and G. K. Owens, “Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation,” *Circ Res*, vol. 71, no. 6, pp. 1525–1532, 1992, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423945>.
- [243] M. Y. Speer *et al.*, “Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries,” *Circ. Res.*, 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183053.
- [244] M. W. Majesky *et al.*, “Differentiated Smooth Muscle Cells Generate a Subpopulation of Resident Vascular Progenitor Cells in the Adventitia Regulated by Klf4,” *Circ. Res.*, 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309322.
- [245] D. Shepro and N. M. Morel, “Pericyte physiology,” *FASEB J*, vol. 7, no. 11, pp. 1031–1038, 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370472>.

- [246] J. De Vos, J. Bouckenheimer, C. Sansac, J. M. Lemaître, and S. Assou, "Human induced pluripotent stem cells: A disruptive innovation," *Current Research in Translational Medicine*. 2016, doi: 10.1016/j.retram.2016.04.001.
- [247] S. S. Rensen, P. A. Doevendans, and G. J. van Eys, "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity," *Neth Hear. J*, vol. 15, no. 3, pp. 100–108, 2007, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612668>.
- [248] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease," *Physiol Rev*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, 2004, doi: 10.1152/physrev.00041.2003.
- [249] A. Kumar *et al.*, "Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts," *Cell Rep.*, vol. 19, no. 9, pp. 1902–1916, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.019.
- [250] P. Y. Chen, L. Qin, G. Li, G. Tellides, and M. Simons, "Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGFβ)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep33407.
- [251] T. Hashimoto *et al.*, "Heparin recovers AT1 receptor and its intracellular signal transduction in cultured vascular smooth muscle cells," *FEBS Lett.*, 2005, doi: 10.1016/j.febslet.2004.11.093.
- [252] H. Hao, G. Gabbiani, and M.-L. Bochaton-Piallat, "Arterial Smooth Muscle Cell Heterogeneity," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 23, no. 9, pp. 1510–1520, 2003, doi: 10.1161/01.ATV.0000090130.85752.ED.
- [253] C. Farrington-Rock, N. J. Crofts, M. J. Doherty, B. A. Ashton, C. Griffin-Jones, and A. E. Canfield, "Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes," *Circulation*, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000144457.55518.E5.
- [254] A. T. Nguyen *et al.*, "Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction?," *Circ. Res.*, 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.281048.
- [255] Z. Tang, A. Wang, D. Wang, and S. Li, "Smooth muscle cells: to be or not to be? Response to Nguyen et Al.," *Circulation research*. 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.281055.
- [256] Z. Tang *et al.*, "Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases," *Nat. Commun.*, 2012, doi: 10.1038/ncomms1867.
- [257] M. Hayashi, T. S. Li, H. Ito, A. Mikamo, and K. Hamano, "Comparison of intramyocardial and intravenous routes of delivering bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease: An experimental study," *Cell Transplant.*, 2004, doi: 10.3727/000000004783983558.
- [258] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications," *Biotechnology Advances*. 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.002.
- [259] T. Korff, S. Kimmina, G. Martiny-Baron, and H. G. Augustin, "Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness,"

- FASEB J*, vol. 15, no. 2, pp. 447–457, 2001, doi: 10.1096/fj.00-0139com.
- [260] D. Kouroupis, C. Sanjurjo-Rodriguez, E. Jones, and D. Correa, “Mesenchymal Stem Cell Functionalization for Enhanced Therapeutic Applications,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2018, doi: 10.1089/ten.teb.2018.0118.