ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ 'ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ'

Χρήση νανοϋλικών ως ικριώματα για τη στοχευμένη διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων

ΜΠΕΣΛΙΚΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

2020
Ιωάννινα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ 'ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ'

Χρήση νανοϋλικών ως ικριώματα για τη στοχευμένη διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων

ΜΠΕΣΛΙΚΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

2020
Ιωάννινα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Χρήση νανοϋλικών ως ικριώματα για τη στοχευμένη διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων

ΜΠΕΣΛΙΚΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κούκλης Παναγιωτης	**Αγγελίδης Χαράλαμπος**	**Κωλέττας Ευάγγελος**
Επίκουρος Καθηγητής	Καθηγητής	Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων	Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων	Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

UNIVERSITY OF IOANNINA
FACULTY OF MEDICINE

MSc/Post-Graduate Programme 'BASIC BIOMEDICAL SCIENCE'

Use of nanomaterials as scaffolds in Pluripotent Stem Cell cardiac differentiation

EVANGELIA BESLIKA

MASTER THESIS

2020
Ioannina

Περίληψη

Η ανακάλυψη των βλαστικών κυττάρων και η εκμετάλλευση τους για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της σύγχρονης επιστήμης. Μια σύντομη ανασκόπηση στην πορεία των γεγονότων παρέχει τα κατάλληλα εφόδια για την κατανόηση των βασικών αρχών από τις οποίες τα βλαστικά κύτταρα διέπονται. Έτσι, γίνεται αντιληπτή η βασική ανάγκη διαχωρισμού και κατηγοριοποίησής τους σε υποομάδες, μια από τις οποίες αποτελούν τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, μαζί με τα επαγώμενα πολυδύναμα, συνιστούν τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα. Τα τελευταία αποτελούν ίσως το πιο χρήσιμο εργαλείο της επιστήμης, συνδυάζοντας ικανοποιητικό αναπτυξιακό δυναμικό, επιλογές χειρισμού, επιτυχείς διαφοροποιήσεις, ενώ δεν υπόκεινται σε αυστηρούς βιοηθικούς περιορισμούς. Η εκμετάλλευσή τους για επιστημονικούς σκοπούς μπορεί να συνεισφέρει σε κλάδους της εμβρυολογίας, αναγεννητικής ιατρικής, μηχανικής ιστών, ανάπτυξης φαρμάκων, μοντελοποίησης ασθενειών, εξατομικευμένης ιατρικής κ.α.

Οι διαφορετικοί τρόποι καλλιέργειας και διαφοροποίησης που έχουν αναπτυχθεί για τα εμβρϋονικά βλαστικά κύτταρα, παρέχουν τη δυνατότητα επιλογής και προσαρμογής της κάθε μεθόδου ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες, ενώ η ευκολία χειρισμού των κυττάρων αυτών τα καθιστά ιδανικά. Παρόλα αυτά, η επιστήμη των βλαστικών κυττάρων βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο, με αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις να απαιτεί βελτιστοποίηση των μεθόδων, κυρίως της διαφοροποίησης, για την παραγωγή ώριμων κυτταρικών τύπων, συγκρίσιμών με αντίστοιχους In vivo κυτταρικούς πληθυσμούς. Μια υποσχόμενη λύση αποτελεί η νανοτεχνολογία. Η νέα αυτή επιστήμη ασχολείται με την κατασκευή βιοσυμβατών και απολυτα προσαρμόσιμων σε ιδιότητες υλικών, της κλίμακας του νανομέτρου.

Η διαφοροποίηση προς καρδιακούς ιστούς έχει αποτελέσει μια πρόκληση, καθώς οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, ενώ η αναγεννητική ικανότητα του οργάνου, η πολυπλοκότητα και το κυτταρικό μικροπεριβάλλον δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικές ομοιότητες με άλλους καλύτερα μελετημένους ιστούς. Το γραφένιο, νανοϋλικό συνιστώμενο από άνθρακα, με σχετικά εύκολη και οικονομική παρασκευή, φαίνεται να αποτελεί τον κατάλληλο υποψήφιο για τη διευκόλυνση της παραγωγής ώριμων, καρδιακού τύπου, κυττάρων. Επιπλέον έρευνα και βελτιστοποίηση των τεχνικών θα διαλευκάνει τις αλληλεπιδράσεις του γραφενίου με τα προς

διαφοροποίηση κύτταρα, διαφωτίζοντας εμπλεκόμενους, με την ανάπτυξη και λειτουργία των καρδιακών κυττάρων, μηχανισμούς.

Abstract

The discovery of stem cells and their occupancy for research and therapeutic aim constituts a milestone in Science. A brief reference to the progress and the leading facts of the discovery could facilitate the understanding of the basic principles of stem cells. Though, there is an indispensable need of discrimination and classification of stem cells; one of the categories consists the pluripotent stem cells (PSCs).

Embryonic and induced pluripotent stem cells (ESCs, iPSCs) constitute the pluripotent stem cells (PSCs), allocated due to common properties. The latter, are considered to be a valuable tool of science, combining adequate potency, variability in used techniques, successful differentiation, while not subjected in strict bioethical restrictions. Exploitation of them could provide benefit in the fields of embryology, regenerative medicine, tissue engineering, drug development, disease modeling and personalized medicine.

The variety of culture and differentiation methods that can be used according to the demands of each experiment, along with the ease of handling those cells, are providing a great benefit for ESCs. Nevertheless, Stem Cell field is still premature, demanding the optimization of methods, especially in differentiation, in order to provide mature in vivo like cell types. Nanotechnology, implicated in the construction of adjustable and biocompatible materials in the nanometer scale, comprises a promising tool.

Due to lack of understanding of the implicated mechanisms and relevance in regenerative capacity, complexity and cellular microenvironment, to other well-studied tissues, cardiac tissue differentiation is considered to be a challenge. Graphene is a nanomaterial consisted of carbon, which can be produced simply and economically. It appears to be a strong candidate to facilitate the mature cardiac cells' production. Further research and methodology optimization could elucidate graphene-cells interactions, revealing cardiac cells' develop and function key mechanisms.

Περιεχόμενα

	Περίληψη	**6**
	Abstract	**8**
	Περιεχόμενα	**9**
1.	**Εισαγωγή**	**10**
2.	**Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα**	**15**
2.1.	**Ιδιότητες πολυδύναμων ES και iPS κυττάρων**	**15**
2.2.	**Μεθοδοι καλλιέργειας και διαφοροποίησης in vitro**	**18**
2.2.1.	**In vitro διαφοροποίηση δυο διαστάσεων (2D)**	**19**
2.2.2.	**In vitro διαφοροποίηση τριών διαστάσεων (3D)**	**20**
2.2.3.	**Διαφοροποίηση με τη μέθοδο των Gastruloids**	**21**
2.3.	**Διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων σε νανοϋλικά**	**23**
2.3.1.	**Είδη νανοϋλικών**	**24**
2.3.1.1.	**Γραφένιο**	**24**
2.3.2.	**Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της διαφοροποίησης σε νανοϋλικά**	**26**
2.4.	**Στοχευμένη διαφοποποίηση ES κυττάρων σε καρδιακούς ιστούς**	**28**
2.4.1.	**Ο ρόλος γραφενίου στη διαφοροποίηση προς καρδιακούς ιστούς**	**31**
3.	**Σκοπός**	**35**
4.	**Πειραματικές μέθοδοι και Υλικά**	**36**
4.1.	**Χειρισμοί εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων**	**37**
4.1.1.	**Απόψυξη εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων**	**37**
4.1.2.	**Καλλιέργεια εμρυονικών βλαστικων κυττάρων**	**38**
4.1.3.	**Ψύξη και αποθήκευση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων**	**40**
4.1.4	**Διαφοροποίηση εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιακά κύτταρα με τη μέθοδο μαζικής καλλιέργιας**	**41**
4.2.	**Απεικονιστικές τεχνικές**	**42**
4.2.1.	**Ανοσοφθορισμός σε Embryoid Bodies**	**42**
4.2.2.	**Ανοσοϊστοχημεία σε κρυομονιμοποιημένους ιστούς**	**43**
4.3.	**Υλικά**	**44**
4.4.	**Χρήσιμες παρατηρήσεις**	**45**
5.	**Συζήτηση**	**47**
6.	**Βιβλιογραφία**	**49**

1. Εισαγωγή

Ιστορική αναδρομή: από την ανακάλυψη μέχρι σήμερα

Οι πρώτες ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη των βλαστικών κυττάρων φαίνεται να εμφανίζονται κατά τη δεκαετία του ’50, όπου ο John Gurdon και οι συνεργάτες του, μελέτησαν την πυρηνική μεταμόσχευση σε ωοκύτταρα βατράχου *xenopus sp*. Αποτέλεσμα της ερευνάς τους, το 1958, η επιτυχής κλωνοποίηση αμφιβίου με μεταφορά άθικτου πυρήνα, σωματικού, πλήρως διαφοροποιημένου κυττάρου, σε απύρηνο ωοκύτταρο, υποδηλώνοντας έτσι τη δυνατότητα επαναπρογραμματισμού των κυττάρων. Μια άλλη ομάδα ερευνητών στη Σουηδία το 1975, κατάφερε, χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους αλλά διαφορετικό τύπο σωματικού κυττάρου (ώριμο β-λεμφοκύτταρο ικανό να παράγει αντισώματα), να αποδείξει αυτή τη φορά ότι όντως επρόκειτο για επαναπρογραμματισμό ώριμου πλήρως διαφοροποιημένου κυττάρου.

Το 1981 έγινε για πρώτη φορά λόγος για εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού . Οι Martin Evans και Matthew Kaufman κατάφεραν να απομονώσουν και να καλλιεργήσουν in vitro εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από πρώιμη βλαστοκύστη ποντικού, με δυνατότητα διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε σωματικό κύτταρο. Επιπλέον, με τη μέθοδο της γονιδιακής στόχευσης (gene targeting), κατάφεραν να δημιουργήσουν γενετικά τροποποιημένα κύτταρα, τα οποία, μετά από εισαγωγή σε θηλυκό ποντικό, είχαν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία απογόνων με στοχευμένη γονιδιακή αποσιώπιση (knock out).

Το επόμενο βήμα στην ιστορία των βλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε από τον Ian Wilmut, το 1997, με τη ‘δημιουργία’ της Dolly. Η Dolly, το πρώτο κλωνοποιημένο ανώτερο θηλαστικό, προήλθε από τη σύμπτυξη ωοκυττάρου και σωματικού κυττάρου και την εμφύτευσή του σε θετή μητέρα. Ουσιαστικά, η Dolly αποτέλεσε απόδειξη της δυνατότητας επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένου σωματικού κυττάρου στην κατάσταση της ολοδυναμίας. Ωστόσο, ακόμη και ο Wilmut τελικά εγκατέλειψε τη τεχνική της μεταφοράς σωματικού πυρήνα (somatic cell nuclear transfer).

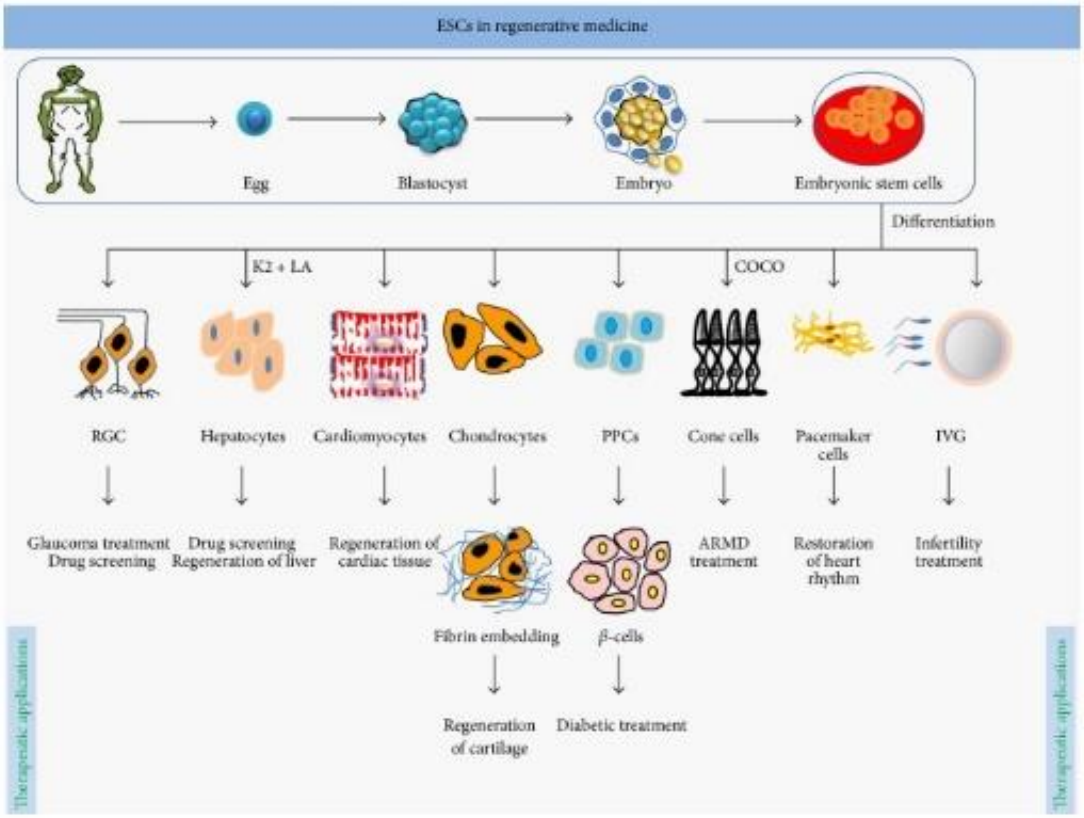
Ένα χρόνο αργότερα, το 1998, τα πρώτα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν στα εργαστήρια των James Thomson και John Gearhart. Εξαιτίας διάφορων πολιτικοοικονομικών, καθώς και βιοηθικών πλέον παραμέτρων, τα πειράματα σε κύτταρα ανθρώπου περιορίστηκαν αρκετά.

Παρόλα αυτά, η πρόοδος στην επιστήμη των βλαστικών κυττάρων τα επόμενα χρόνια ήταν ραγδαία. Το 2006, ο Shunya Yamanaka και οι συνεργάτες του δημιούργησαν για πρώτη φορά τα επαγώμενα βλαστικά κύτταρα (iPSCs, induced pluripotent stem cells), με ιδιότητες πολυδυναμίας όμοιες των εμβρυονικών. Η δημιουργία των κυττάρων αυτών στηρίζεται στην επαγωγή τεσσάρων βασικών γονιδίων σε διαφοροποιημένα

σωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό τους και την επανάκτηση των αρχικών ιδιοτήτων τους, χωρίς να προηγηθεί καταστροφή εμβρύου [1].

Αποτέλεσμα όλης αυτής της έρευνας, η αποκατάστασή τραύματος του νωτιαίου μυελού με φαρμακευτική αγωγή για πρώτη φορά το 2010, η θεραπεία της τύφλωσης το 2012, η εξατομικευμένη παραγωγή θεραπευτικών κλώνων βλαστικών κυττάρων από έμβρυα το 2013, και, ένα χρόνο αργότερα, από αυτόλογα σωματικά κύτταρα, κύτταρα δηλαδή του ίδιου του ασθενούς. Τον ίδιο χρόνο, 2014, κύτταρα του δέρματος διαβητικής ασθενούς επάχθηκαν σε β-παγκρεατικά κύτταρα ικανά να παράγουν ινσουλίνη. Όλα αυτά, συντέλεσαν στην εκκίνηση των κλινικών πλέον δοκιμών σε ανθρώπους, αρχικά για τη θεραπεία της τύφλωσης λόγω γήρανσης και στη συνέχεια για πολλές άλλες παθήσεις, θέτοντας έτσι τα θεμέλια για την ταχύτατη ανάπτυξη και πρόοδο της αναγεννητικής ιατρικής και μηχανικής ιστών [2, 3].

Σήμερα, η τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων βρίσκει εφαρμογές στην αναγέννηση ιστών και οργάνων, μετά από τραυματισμό ή ασθένεια στην οποία ο ίδιος ο οργανισμός αδυνατεί να ανταπεξέλθει και οι συμβατικές θεραπείες αποτυγχάνουν. Με τη δημιουργία και εισαγωγή συμβατών κυττάρων, ιστών ακόμη και ολόκληρων οργάνων επιτυγχάνεται η αντιμετώπιση και θεραπεία, προσωρινή ή και εφόρου ζωής σε ορισμένες περιπτώσεις, αποφεύγοντας παρενέργειες των διάφορων φαρμάκων ή αντιδράσεις του ανοσοποιητικού [4, 5].



Εικόνα 1. *Προέλευση Εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και δυνατότητες διαφοροποίησης*. (Mahla, 2016)

Ορισμοί και κατηγορίες

Για το μεγάλο ενδιαφέρουν που έχουν προσελκύσει τα βλαστικά κύτταρα ευθύνεται ο ρόλος τους και οι δυνατότητες που μπορούν να παρέχουν στο πεδίο της ιατρικής. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία όλων των εξωεμβρυικών, εμβρυικών και ενήλικων σωματικών ιστών. Αποτελούν, επίσης, την 'κυτταρική δεξαμενή' για την επισκευή και αναδημιουργία όλων των ιστών κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Ο κύριος ορισμός τους αναφέρεται στις δυο χαρακτηριστικές ιδιότητες που τα διακρίνουν από τα υπόλοιπα κύτταρα, την ικανότητα **Αυτόανανέωσης** του πληθυσμού τους και την ικανότητα **Διαφοροποίησης** τους σε οποιοδήποτε κυτταρικό πληθυσμό. Τα αδιαφοροποίητα αυτά κύτταρα όταν διαιρεθούν, παρέχουν στους κυτταρικούς απογόνους τους τη δυνατότητα επιλογής της μιας από τις δυο δυνατές κατευθύνσεις, την παραμονή στην αδιαφοροποίητη κατάσταση και τον θεωρητικά αέναο πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση προς κάποια κυτταρική σειρά, χωρίς δυνατότητα επιστροφής στην προηγούμενη κατάσταση [6, 7]. Παρολα αυτά, ο ορισμός αυτός θεωρείται γενικευμένος και ασαφής όσον αφορά την περιγραφή όλων των κυττάρων που ονομάζονται βλαστικά. Κύτταρα που έχουν δεσμευτεί προς κάποια κυτταρική σειρά, χωρίς να αποτελούν πλήρως διαφοροποιημένα και ώριμα σωματικά κύτταρα, στερούνται όμως της δυνατότητας να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση, ως απόκριση φυσιολογικών διεργασιών, ανήκουν επίσης στην ίδια κατηγορία. Τα κύτταρα αυτά, όντας 'εγκλωβισμένα' σε μία ενδιάμεση κατάσταση, παρουσιάζουν κάποιες ιδιότητες βλαστικών και ταυτόχρονα πιο εξειδικευμένων κυττάρων (progenitor stem cells). Έτσι, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η κατηγοριοποίηση τους για τον καλύτερο προσδιορισμό τους [8].

Από την κατηγοριοποίηση των κυττάρων, ως προς το αναπτυξιακό στάδιο από το οποίο λαμβάνονται, προκύπτουν τέσσερις ομάδες:

- Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs, embryonic stem cells)

  Τα κύτταρα αυτά λαμβάνονται από το στάδιο της βλαστοκύστης κατά την πρώιμη εμβρυογένεση και έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιονδήποτε εμβρυικό ιστό, όχι όμως εξωεμβρυικό. Δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του εμβρύου, με αποτέλεσμα να αποτελούν μια χρήσιμη πηγή κυττάρων για μελέτη.

- Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (FSCs, Fetal stem cells)

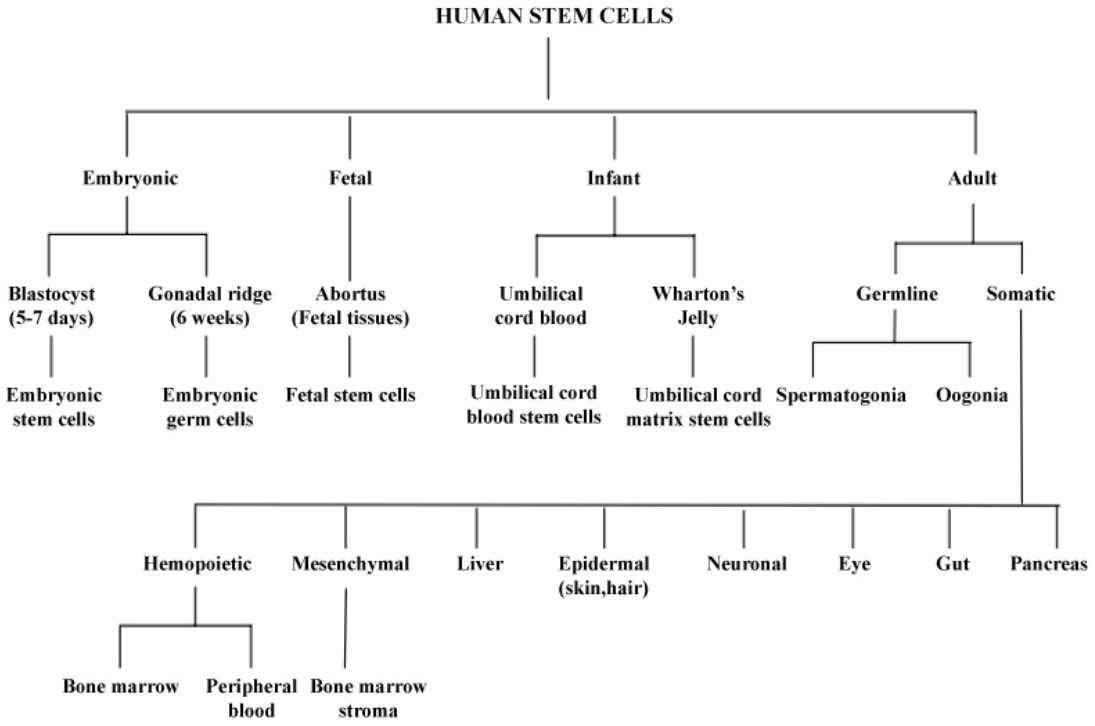
  Λαμβάνονται από το όργανα του εμβρύου κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, γεγονός επικίνδυνο για το έμβρυο, ή από έμβρυα μετά από διακοπή της κύησης. Εγείρουν ηθικά ζητήματα, συνεπώς δεν αποτελούν ιδανική πηγή κυττάρων.

- Βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από τον ομφάλιο λώρο (Umbilical cord stem cells)

Σχετικά εύκολα και ανώδυνα, λαμβάνονται από τον ομφάλιο λώρο κατά την ολοκλήρωση της κύησης. Αποτελούν κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου, με πεπερασμένες δυνατότητες διαφοροποίησης.

- Βλαστικά κύτταρα ενηλίκων (ASCs, Adult stem cells)

Τα κύτταρα αυτά, με περιορισμένες δυνατότητες διαφοροποίησης, βρίσκονται στα όργανα και το αίμα κάθε οργανισμού με σκοπό τη συντήρηση και επισκευή του και χωρίζονται σε περαιτέρω κατηγορίες όπως, αιμοποιητικά (HSCs, Hematopoietic stem cells) που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, μεσεγχυματικού τύπου (MSCs, Mesenchymal stem cells) στο στρώμα του μυελού των οστών, νευρικά (NSCs, Neuronal stem cells), επιδερμικά στις τρίχες και το δέρμα, παγκρεατικά κ.α.



Εικόνα 2. *Είδη βλαστικών κυττάρων και προέλευση.* (Kitada, 2012)

Μια επιπλέον κατηγορία που θα μπορούσε να προστεθεί εδώ είναι και τα Επαγώμενα βλαστικά κύτταρα (iPSs, induced Pluripotent stem cells), τα οποία προκύπτουν από επαγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων με αποτέλεσμα την επαναφορά τους σε πιο αδιαφοροποίητο στάδιο. Τα κύτταρα αυτά προέκυψαν μετά από εισαγωγή των τεσσάρων βασικών μεταγραφικών παραγόντων (Oct3/4, Sox2, Klf4, και c-Myc σε τρωκτικά και Oct4 , Sox2 , Nanog , και Lin28 στον άνθρωπο) των βλαστικών κυττάρων [9, 10]. Αν και παρουσιάζουν ομοιότητες στη μορφολογία, στον πολλαπλασιασμό, στα αντιγόνα επιφανείας, στη γονιδιακή έκφραση, επιγενετική κατάσταση και τη δραστηριότητα τελομεράσης, με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, δεν κατατάχθηκαν στην παραπάνω κατηγοριοποίηση, αφού αποτελούν

προϊόντα ανθρώπινης παρέμβασης και in vitro επεξεργασίας. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα κύτταρα αποτελούν χρήσιμο εργαλείο, αφού δεν υπάρχουν αυστηροί βιοηθικοί περιορισμοί, ενώ η χρησιμότητά τους στη δημιουργία κυτταρικών σειρών για ελέγχους φαρμάκων και αυτόλογων μοσχευμάτων που περιορίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις είναι τεράστια [11, 12].

Τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα, ενώ μοιάζουν να αποτελούν το ιδανικό εργαλείο τόσο για την έρευνα, όσο και την αναγεννητική ιατρική, παρουσιάζουν αρκετά επικίνδυνα μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι το γεγονός ότι για τη μεταφορά των 4 γονιδίων στα σωματικά κύτταρα και την επαγωγή τους σε βλαστικά, οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ήταν ιϊκοί (retroviruses, lentiviruses). Οι ενσωμάτωση γονιδίων μέσω ιϊκών φορέων ελλοχεύει κινδύνους, όπως η τυχαία ενσωμάτωση των ιών στο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή, ο τυχαίος αριθμός αντιγράφων που ενσωματώνονται ανά κύτταρο και η αδυναμία δημιουργίας τυποποιημένων κυτταρικών σειρών. Αποτέλεσμα αυτών, και δεδομένου ότι τα εισαγόμενα γονίδια προάγουν διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είναι η αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης νεοπλασιών, όπως έχει παρατηρηθεί, καθώς και εμφάνιση άλλων ασθενειών [13]. Μελέτες εναλλακτικών τρόπων παραγωγής τους προσπαθούν να δώσουν λύση σε αυτά τα προβλήματα καθιστώντας τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα ένα ασφαλές εργαλείο έρευνας.

Εναλλακτικά τα βλαστικά κύτταρα θα μπορούσαν να διαχωριστούν με βάση τις διαφορετικές ιδιότητές/δυνατότητές τους (potency):

- Ολοδύναμα (Totipotent)

Τα κύτταρα από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι το στάδιο των βλαστομερών των 4 κυττάρων, ικανά να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε εξωεμβρυικό ή εμβρυικό ιστό, δημιουργώντας έναν άρτιο οργανισμό.

- Πολυδύναμα (Pluripotent)

Κύτταρα ικανά να δημιουργήσουν όλους τους εμβρυικούς ιστούς (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα), αλλά όχι εξωεμβρυικούς που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του εμβρύου. Τέτοιου είδους κύτταρα είναι τα εμβρυονικά και επαγώμενα βλαστικά κύτταρα [14].

- Ολιγοδύναμα ή Πλειοδύναμα (Multipontent)

Κύτταρα εμβρυικών ή ώριμων ιστών που παρουσιάζουν μειωμένο αναπτυξιακό δυναμικό σε σχέση με τα προηγούμενα, όπως τα ενήλικα βλαστικά.

Ως αναπτυξιακό δυναμικό ορίζεται το σύνολο των δυνατών καταστάσεων διαφοροποίησης, μετά από οποιαδήποτε παρέμβαση στο περιβάλλον του κυττάρου ή ιστού [15].

2. Πολυδύναμα Βλαστικά κύτταρα

2.1 Ιδιότητες πολυδύναμων ES και iPS κυττάρων

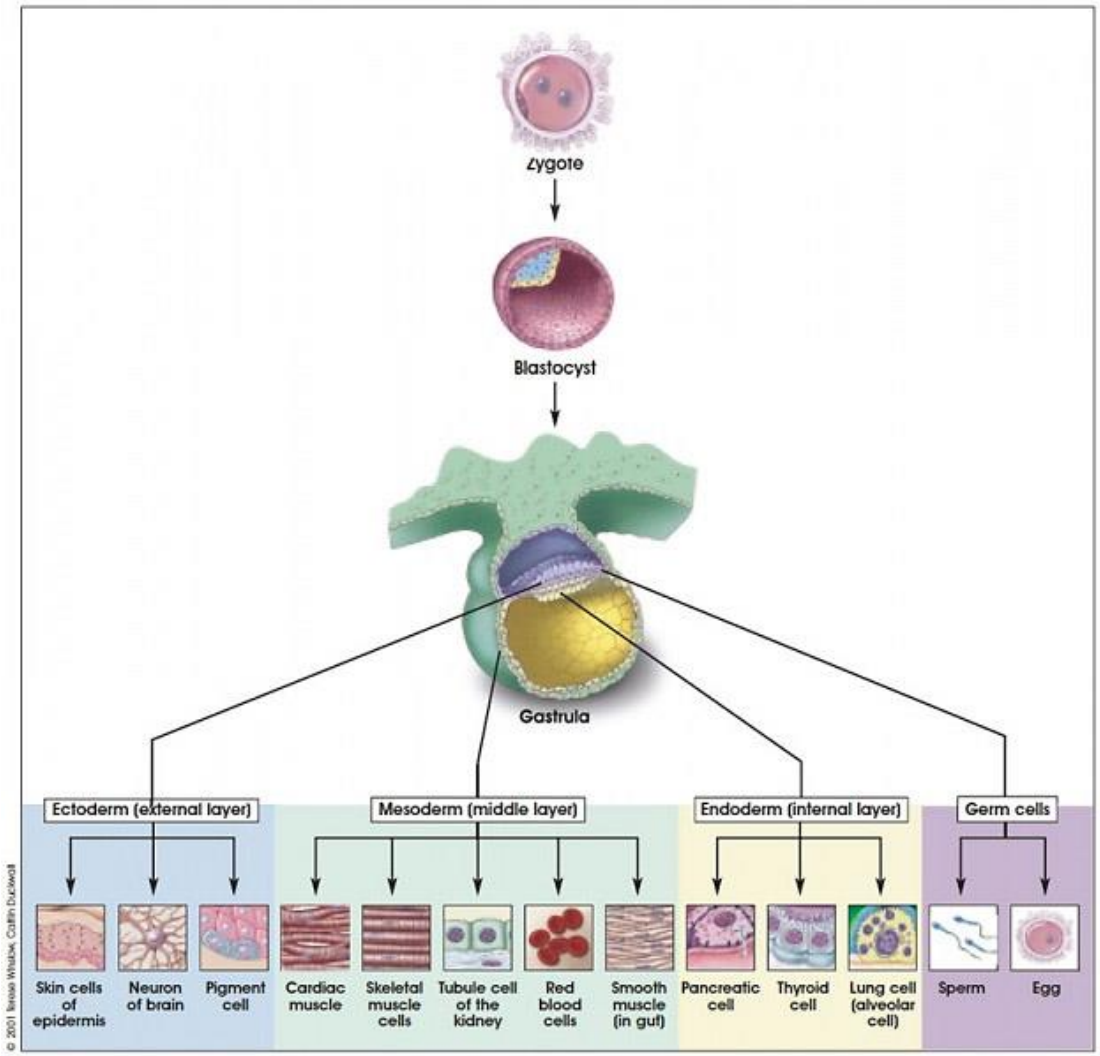
Σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή κυττάρων σε έμβρυα πρώιμου σταδίου, που κατόπιν επεξεργασίας βρισκόταν σε τετραπλοϊδική κατάσταση, καθόρισε τα τρία βασικά κριτήρια της πολυδυναμίας [16]. Σημαντικότερο αυτών αποτελεί η ικανότητα σχηματισμού ολόκληρου του πληθυσμού κυττάρων ενός φυσιολογικού οργανισμού-απογόνου [17]. Ένα άλλο κριτήριο σχετίζεται με την, αν όχι καθολική, ευρεία διάδοση των ξένων κυττάρων στον απογονικό οργανισμό, καθιστώντας τον χιμαιρικό, μετά από ενέσιμη εισαγωγή τους σε βλαστοκύστη ή ενσωμάτωση τους στο στάδιο του μοριδίου [18]. Τέλος, η ικανότητα σχηματισμού τερατωμάτων μετά από έκτοπο εμβολιασμό σε ιστοσυμβατό ή ανοσοκατεσταλμένο οργανισμό καθορίζει εάν ένα κύτταρο ανήκει στην κατηγορία των πολυδύναμων κυττάρων [19].

Στην κατηγορία των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ανήκουν τα εμβρυονικά βλαστικά και τα επαγώμενα βλαστικά κύτταρα. Τα πρώτα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) που μελετήθηκαν, προήλθαν από βάστοκύστες ζωικών μοντέλων ποντικού και έτσι τα συγκεκριμένα κύτταρα πήραν την ονομασία αυτή, λαμβάνοντας ως δεδομένο ότι θα παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά και ιδιότητες και στους υπόλοιπους οργανισμούς. Παρόλα αυτά, μετά από μελέτες σε κύτταρα προερχόμενα από διαφορετικούς οργανισμός, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο σε κυτταρικό όσο και μοριακό επίπεδο.

Τα κύτταρα διαφορετικών οργανισμών, ακόμα και διαφορετικών ειδών τρωκτικών, διέφεραν στη συμπεριφορά από αυτά των ποντικών με άμεση συνέπεια την ανάγκη για νέες μελέτες ως αναφορά στο χειρισμό και την καλλιέργειά τους, την ανάγκη διαφόρων αυξητικών παραγόντων ή βοηθητικών κυττάρων, τις μεθόδους και συνθήκες διαφοροποίησης κ.α. Για τη διάκριση των κυττάρων που λαμβάνονται από το στάδιο της βλαστοκύστης από κάθε άλλο οργανισμό, εκτός του ποντικού, και φέρουν παρόμοιες ιδιότητες μ’αυτά, τα πρώτα ονομάστηκαν ομοιάζοντα με βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cell-Like, ESL). Στην παρούσα μελέτη, παρόλο που στηρίχτηκε σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, δε θα γίνει διάκριση μεταξύ αυτών και άλλων οργανισμών και όλα τα κύτταρα για λόγους απλοποίησης και γενίκευσης θα ονομάζονται εμβρυονικά βλαστικά (ESCs).

Τα Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, με σχετικά απεριόριστη ικανότητα αυτοανανέωσης καθώς και δυνατότητα διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε σωματικό κύτταρο, προέρχονται από το προεμφυτευτικό έμβρυο. Λαμβάνονται συνήθως από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM, Inner Cell Mass) στο σταδιο της

βλαστοκύστης, ενώ είναι δυνατό να ληφθούν και από το στάδιο του μοριδίου, γεγονός που εγείρει βιοηθικούς περιορισμούς. Είναι κύτταρα που έχουν δεσμευτεί για τη δημιουργία της επιβλάστης, η οποία στη συνέχεια θα δώσει τους τρεις εμβρυικούς ιστούς εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα. Κάθε ένας από τους εμβρυικούς αυτούς ιστούς αποτελεί πρόγονο διαφορετικών ώριμων ιστών. Έτσι, από το εξώδερμα θα προκύψει το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ και ΠΝΣ), το δέρμα και οι τρίχες κ.α., το μεσόδερμα θα δώσει το καρδιαγγειακό σύστημα, τα οστά και το συνδετικό ιστό, το ουροποιητικό και γεννητικό σύστημα, και τους μυϊκούς ιστούς, ενώ από το ενδόδερμα προέρχονται το πάγκρεας, το συκώτι, το αναπνευστικό και πεπτικό σύστημα. Μια άλλη κατηγορία που θα μπορούσε να προστεθεί εδώ είναι η γεννητική βλαστική σειρά (germ line), που ευθύνεται για τη δημιουργία των γαμετών, καθώς προέρχεται απευθείας από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και όχι από κάποιο εμβρυϊκό ιστό.



Εικόνα 3. *Εμβρυικοί ιστοί.*

Τα Επαγώμενα βλαστικά κύτταρα (iPSCs ή iPS, induced Pluripotent Stem Cells), όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν προϊόντα ανθρώπινης in vitro επεξεργασίας οποιουδήποτε ώριμου σωματικού κυττάρου. Το 2006 ο Shinya Yamanaka και η ομάδα του, μέσα από πειράματα, διαπίστωσαν ότι κύτταρα με ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μπορούν να δημιουργηθούν από ώριμους ινοβλάστες ποντικού [9]. Εισάγοντας σε αυτούς 4 βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, απαραίτητους κατά την εμβρυογένεση (Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc), επέλεξαν τους κλώνους που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, υποδεικνύοντας ότι είχαν επαναπρογραμματιστεί σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση πολυδυναμίας [20]. Τα πειράματα αυτά είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πρώτης γενιάς επαγόμενων βλαστικών κυττάρων. Ένα χρόνο αργότερα, το 2007, τρεις ερευνητικές ομάδες ξεχωριστά δημιούργησαν τη δεύτερη γενιά τέτοιων κυττάρων με βασική διαφορά ότι η επιλογή των κλώνων πραγματοποιήθηκε με βάση την έκφρασή των παραγόντων Oct4 ή Nanog. Η νέα αυτή γενιά κυττάρων ήταν πανομοιότυπη με τα εμβρυονικά βλαστικά, ικανά να δημιουργήσουν χιμαιρικούς απογόνους και να εποικίσουν τη γαμετική κυτταρική σειρά [18, 21, 22]. Επιπλέον μετά από εισαγωγή τους έκτοπα σε ζώα παρουσίαζαν ικανότητα δημιουργίας τερατωμάτων, πληρώντας έτσι και τα τρία κριτήρια της πολυδυναμίας. Σήμερα, η χρήση των επαγώμενων βλαστικών κυττάρων είναι ευρέως διαδεδομένη, ανοίγοντας νέους ορίζοντες, τόσο στην έρευνα όσο και στην αναγεννητική ιατρική, καθώς δεν υπάρχουν αυστηροί βιοηθικοί περιορισμοί, ενώ υπερνικείται το πρόβλημα της ιστοσυμβατότητας.

Αναφορικά με τις ιδιότητες των πολυδύναμων κυττάρων, αυτά μπορούν να διακριθούν με βάση τη μορφολογία, το στάδιο του κυτταρικού κύκλου, τη γονιδιακή έκφραση και τις επιγενετικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκεινται. Έτσι μορφολογικά χαρακτηρίζονται από υψηλή αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, διακριτούς πυρηνίσκους, και σχηματίζουν αυθαίρετα πολυστρωματικές αποικίες. Η διαυγής μορφολογία του πυρήνα και των συστατικών του καθώς και η ευδιάκριτη δομή της χρωματίνης αποτελούν δυο ακόμη μορφολογικές ιδιότητες [23]. Σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο, παρουσιάζουν μια βράχυνση της φάσης G1 και γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης [24-26]. Αντίκτυπο της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί η παρουσία εμβρυικών αντιγόνων επιφανείας, όπως SSEA και TRA-1, η ενεργότητα τελομεράσης και αλκαλικής φωσφατάσης, καθώς και η έκφραση των τριών βασικών μεταγραφικών παραγόντων, OCT4, Sox2 και Nanog, καθώς και άλλων [27-29]. Εκτός της παρουσίας των παραγόντων αυτών, κρίσιμη είναι και η συγκέντρωσή τους [16]. Μελέτες σχετικά με τις επιγενετικές τροποποιήσεις αποκάλυψαν χαρακτηριστική δομή χρωματίνης λόγω τροποποίσεων στις ιστόνες [30, 31]. Τέλος, χαρακτηριστικά microRNAs (miRNAs) παρατηρήθηκαν, που φαίνεται να είναι συντηρημένα στα διάφορα είδη οργανισμών, υποδηλώνοντας την καθολική διαειδική κατάσταση πολυδυναμίας [32, 33].

2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και διαφοροποίησης in vitro

Ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων κάθε είδους είναι ο 'Θώκος' (niche). Ο όρος αυτός περιλαμβάνει όλα τα ανατομικά στοιχεία του φυσιολογικού μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων, κυτταρικά και ακυτταρικά, σε έναν ιστό και κατ' επέκταση σε έναν οργανισμό [34]. Έτσι, ο Θώκος μπορεί να απαρτίζεται από κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενδοθήλιο και νευρώνες, μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως ινοβλάστες και κύτταρα του λιπώδους ιστού, και κύτταρα του υποστρώματος, όπως οστεοβλάστες ή μυϊκά κύτταρα. Στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον συμπεριλαμβάνονται επίσης κυτταρικές δομές, όπως σύνδεσμοι προσκόλλησης, εστιακές προσφύσεις και μεμβρανικοί υποδοχείς, και μη κυτταρικές δομές, όπως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, αυξητικοί παράγοντες, κυττοκίνες, χημοκίνες και μικρά ιόντα. Συμπερασματικά, για τους in vitro χειρισμούς κυττάρων κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία Θώκου με ιδιότητες παρόμοιες του φυσικού.

Οι διάφορες μέθοδοι καλλιέργειας των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων σχετίζονται με το είδος τους. Κάθε κύτταρο, ανάλογα με το είδος του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται παρουσιάζει και διαφορετικές ανάγκες και απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα το είδος των αυξητικών παραγόντων και οι ποσότητές τους, οι αναλογίες των θρεπτικών ουσιών και η συχνότητα χορήγησης, ο απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό χώρος. Έτσι ακόμα και κύτταρα προερχόμενα από ίδιο οργανισμό αλλά διαφορετική κυτταρική σειρά απαιτούν ιδιαίτερους χειρισμούς [35].

Ο όρος διαφοροποίηση in vitro αναφέρεται στη διαδικασία κατευθυνόμενης μετατροπής αδιαφοροποίητων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων σε συγκεκριμένο ώριμο κυτταρικό πληθυσμό με ιδιότητες του αντίστοιχου πληθυσμού σε ένα φυσιολογικό οργανισμό. Εδώ προστίθενται επιπλέον παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της διαφοροποίησης. Αρχικά το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης που χρησιμοποιείται είναι διαφορετικό, όπως και η συχνότητα χορήγησής του. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που θέλουμε να αποκτήσουμε επιλέγονται συγκεκριμένοι παράγοντες διαφοροποίησης ενώ η παύση χορήγησης των αυξητικών παραγόντων πολυδυναμίας είναι απαραίτητη. Τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν αυστηρά καθορισμένα χρονοδιαγράμματα ώστε να γίνει εφικτή η πραγματοποίηση του στόχου.

Με το πέρασμα του χρόνου και συνεχή έρευνα, έχουν καθιερωθεί συγκεκριμένοι τρόποι διαφοροποίησης με τα ανάλογα πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματά τους. Έχει δειχθεί ότι καθένας από τους τρόπους διαφοροποίησης μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο το αποτέλεσμα, έτσι θα πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή της μεθόδου ανάλογα με την περίπτωση [36]. Παρόλα αυτά η διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς όλες τις κατευθύνσεις είναι εφικτή,

συνήθως με περισσότερες από μια μεθόδους [37]. Εδώ είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η σύγκριση μεθόδων για συγκεκριμένα πειράματα θα πρέπει να γίνεται εξετάζοντας πολλούς παράγοντες ώστε να μην οδηγήσει σε λάθη, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι εφικτή [38].

2.2.1 In vitro διαφοροποίηση δυο διαστάσεων (2D)

Η απλούστερη και παλαιότερη μέθοδος in vitro διαφοροποίησης βλαστικών κυττάρων είναι αυτή των δυο διαστάσεων. Σχετικά οικονομική και λιγότερο χρονοβόρα μέθοδος, περιλαμβάνει την τοποθέτηση κυττάρων σε επιφάνειες προωθώντας την επίπεδη διάδοση τους. Καλλιέργειες δυο διαστάσεων μπορούν να πραγματοποιηθούν πάνω σε υλικά, όπως γυαλί ή πλαστικό, σε πρωτείνες της εξωκυττάριας ύλης ή ακόμη και στρώμα υποστηρικτικών κυττάρων [37, 39]. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται περιέχει τους κατάλληλους παράγοντες διαφοροποίησης, οι οποίοι μπορούν να διαχέονται εύκολα μέσα σ’ αυτό, με αποτέλεσμα να είναι προσβάσιμοι σε όλα τα κύτταρα. Καλλιέργειες κυττάρων με τη μέθοδο αυτή επιτρέπουν την παρατήρηση κυτταρικών διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση. Η παρατήρηση και ανάλυση φαινοτύπου είναι εφικτή ακόμη και με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, καθιστώντας πιο εύκολη την απομόνωση επιθυμητών κλώνων. Πολλές από τις κυτταρικές διεργασίες διευκολύνονται, ενώ τα στρώματα αυτά κυττάρων ευνοούν τις μελέτες έκκρισης παραγόντων ή επίδρασης φαρμάκων. Ενδείκνυται για διαφοροποίηση κυττάρων που και in vivo παρουσιάζουν απλές δομές, όπως τα διάφορα επιθήλια.

Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος καλλιέργειας δεν ενδείκνυται για πολλούς κυτταρικούς τύπους, που φυσιολογικά σχηματίζουν πολύπλοκες δομές, αφού αποτελεί μια υπεραπλουστευμένη μορφή προσομοίωσης του φυσικού τους περιβάλλοντος, προωθώντας μη φυσιολογική κυτταρική συμπεριφορά. Επιτρέποντας μόνο την επιφανειακή προσκόλληση του κυττάρου από τη μια πλευρά, με μειωμένες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μόνο μεταξύ των κυττάρων που συνορεύουν, ωθεί τα κύτταρα σε συγκεκριμένη μορφή και βασική-επιφανειακή πολικότητα. Η αναλογία δραστικής επιφάνειας προς όγκο μεταβάλλεται, επηρεάζοντας τη μετάδοση σημάτων, ενώ καθίσταται αδύνατη δημιουργία διακυτταρικής πολικότητας λόγω ρευστότητας του μέσου, στο οποίο οι διάφοροι παράγοντες διαχέονται [39, 40]. Τέλος, η ακαμψία που παρουσιάζουν οι υποστηρικτικές δομές συχνά εκτός από τη μορφή και την προσκόλληση, επηρεάζει και την ίδια τη διαφοροποίηση και διατήρησή της και τη βιωσιμότητα των κυττάρων [41-43].

2.2.2 In vitro διαφοροποίηση τριών διαστάσεων (3D)

Η διαφοροποίηση δυο διαστάσεων έχει συμβάλει καθοριστικά στη μελέτη των πολλών κυτταρικών τύπων. Παρόλα αυτά παρουσιάζει μειονεκτήματα τα οποία μπορούν να απαλειφθούν προσθέτοντας μια ακόμα διάσταση. Έτσι οδηγούμαστε στις καλλιέργειες τριών διαστάσεων [44]. Οι καλλιέργειες αυτές, παρέχουν ένα περιβάλλον κυτταρικής αλληλεπίδρασης και μηχανικής υποστήριξης που επιτρέπει την δημιουργία πιο πολύπλοκων αρχιτεκτονικών δομών. Οι δομές αυτές ονομάζονται σφαιροειδή (spheroids) και αποτελούνται από συσσωματώματα μεγάλου αριθμού κυττάρων που επικοινωνούν και διαφοροποιούνται συντονισμένα [45].

Για την επίτευξη των σφαιροειδών υπάρχουν δύο τεχνικές. Η πρώτη, hanging drops method, αναπτύχθηκε το 1994 και αναφέρεται στην τοποθέτηση κυττάρων σε σταγόνες θρεπτικού μέσου στην πάνω σε τρυβλίο Petri, που στη συνέχεια αντιστρέφεται, ώστε οι σταγόνες να κρέμονται. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται, τόσο στην επιφανειακή τάση των μικρών ποσοτήτων υγρού, που δημιουργούν απομονωμένους χώρους, όσο και στη βαρύτητα η οποία έλκει τα κύτταρα στο κάτω μέρος της κάθε σταγόνας, μειώνοντας τις μεταξύ τους αποστάσεις, ώστε να αρχίζουν να αλληλοεπιδρούν, ενώ περιορίζονται χωρικά αποτρέποντας τις αλληλεπιδράσεις με άλλα κύτταρα εκτός αυτών που βρίσκονται στην ίδια σταγόνα. Η άλλη μέθοδος χρησιμοποιείται για δημιουργία μεγαλύτερων ποσοτήτων σφαιροειδών και πραγματοποιείται με τη χρήση βιοαντιδραστήρων. Αυτή στηρίζεται στη συνεχή ανάδευση των κυττάρων μέσα στο θρεπτικό μέσο, με αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας πρόσληψης θρεπτικών και κατά συνέπεια επιβίωσης και ανάπτυξης, καθώς και τη συνεχή κυτταρική επαφή που μπορεί εύκολα να προκαλέσει τη δημιουργία συσσωματωμάτων [46-48].

Μια άλλη μορφή 3D διαφοροποίησης είναι τα οργανοειδή, και συγκεκριμένα για τα καρδιακά κύτταρα, τα καρδιακά οργανοειδή (Cardiac Organoids/ Cardioids). Τα οργανοειδή αποτελούν 3D μικρογραφίες οργάνων με πρακτικές εφαρμογές στη μελέτη της οργανογένεσης, μοντελοποίηση ασθενών και δημιουργία μοσχευμάτων. Δημιουργούνται παρέχοντας στα κύτταρα κατάλληλο φυσικό περιβάλλον για κυτταρική προσκόλληση και επιβίωση και βιοχημικό περιβάλλον, ρυθμίζοντας τα απαραίτητα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αποτελούν πιο εξελιγμένη μορφή από τα σφαιροειδή, επιτρέποντας μεγαλύτερο εύρος πειραμάτων. Μέχρι τώρα έχουν δημιουργηθεί επιτυχώς οργανοειδή για το πάγκρεας, το συκώτι, το έντερο, τον πνεύμονα, το στομάχι κ.α. Βασική αρχή τους είναι η μίμηση δομών και λειτουργιών των αντίστοιχων οργάνων. Παρόλα αυτά παρουσιάζονται αρκετές διαφορές με τα αντίστοιχα όργανα, εξαιτίας περιορισμών όπως η αδυναμία αγγείωσης και η έλλειψη βασικών για τα φυσιολογικά όργανα, κυτταρικών τύπων [46].

2.2.3. Διαφοροποίηση με τη μέθοδο των Gastruloids

Τα Gastruloids (‘Γαστρουλωειδή’), τα ‘τεχνητά’ έμβρυα, όπως αποκαλούνται, αποτελούν τη νέα, πλέον προηγμένη μορφή διαφοροποίησης, στο πεδίο της εμβρυολογίας, με εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η ονομασία προήλθε από το σχηματισμό των βλαστικών δερμάτων, που στα φυσιολογικά έμβρυα που συμβαίνει στο στάδιο της γαστριδίωσης. Σε αντίθεση με την 2D διαφοροποίηση που παρέχει πληροφορίες κυρίως για κυτταρικούς μηχανισμούς, και την πιο εξελιγμένη 3D που αποτελεί μια προσέγγιση στο επίπεδο οργάνου-ιστού, επιτρέποντας και τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των διάφορων κυττάρων, η μέθοδος των Gastruloids εστιάζει στην κλίμακα του πρώιμου οργανισμού [49]. Το Gastruloid προσδιορίζεται ως αυτόσυναρμολογούμενη άμορφη μάζα που μοιάζει με έμβρυο στο στάδιο της γαστριδίωσης [50]. Η μέθοδος στηρίζεται στην έμφυτη ικανότητα των κυττάρων να συγκεντρώνονται και να οργανώνονται σε περίπλοκες λειτουργικές δομές, σχηματίζοντας όργανα και ιστούς με τελικό αποτέλεσμα τον οργανισμό [51]. Καθίσταται, λοιπόν, πιθανότερη η κατανόηση της εμβρυογένεσης και των μηχανισμών της. Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην κυτταρική οργάνωση και αυτοσυγκρότηση, την εμβρυική συμμετρία, το μέγεθος και το συγχρονισμό όλων των ιστών ώστε να δημιουργηθεί ένας άρτιος οργανισμός, έρχονται στο φως. Οι δυνατότητες κατανόησης υποκυτταρικών και μοριακών γεγονότων και του τρόπου που επηρεάζουν την ανάπτυξη παρέχονται, οδηγώντας σε μια πιο σφαιρική αντίληψη της διαδικασίας της εμβρυογένεσης.

Εκθέτοντας πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα σε περιβάλλον πλούσιο σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης, παρατηρείται ο σχηματισμός οριοθετημένων αποικιών με καθορισμένο μέγεθος και σφαιρικό συμμετρικό σχήμα. Επακόλουθη προσθήκη μορφογενετικών παραγόντων επάγει τη διαφοροποίηση κυττάρων και την έκκριση παραγόντων αυτοκρινούς και παρακρινούς ρύθμισης. Εξαιτίας της σφαιρικότητας των δομών αυτών, μόνο τα κύτταρα της εξωτερικής στιβάδας έρχονται σε επαφή με τους μορφογενετικούς αυξητικούς παράγοντες, που παρέχονται στιγμιαία και σε συγκεκριμένες ποσότητες, και ως απόκριση της διαβάθμισης αυτής ξεκινά η διαδικασία σχηματισμού των βλαστικών δερμάτων [52, 53].

Εξωτερικά σχηματίζεται ένα είδος τροφοεξωδέρματος, εκκινώντας μια κατάσταση πολικότητας. Το πρώτο καθοριστικό γεγονός λαμβάνει χώρα με την άρση της συμμετρίας. Συγκεκριμένη περιοχή, που ονομάζεται κέντρο Nieuwkoop, δημιουργεί τον οργανωτή Spemann-Mangold, μέσω τοπικών επαγωγικών σημάτων [54]. Ο οργανωτής αυτός αποτελεί πηγή επακόλουθων σημάτων προς τα γειτονικά κύτταρα με τελικό αποτέλεσμα την αξονική οργάνωση. Τα σήματα αυτά ορίζουν το διαφοροποιητικό πεπρωμένο κάθε κυττάρου και τη συνακόλουθη κυτταρική μετανάστευση. Στο στάδιο αυτό, τα βλαστοκύτταρα έχουν ήδη διαφοροποιηθεί ως

απόκριση σε αυξητικό παράγοντα και βρίσκονται οργανωμένα σε συγκεντρικούς δακτυλίους των εμβρυονικών βλαστικών δερμάτων, με σειρά από το κέντρο, ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα, περιβαλλόμενα από το τροφοεξώδερμα, όπως και στην επιβλάστη [55]. Η γονιδιακή έκφραση, πλέον, ρυθμίζεται με βάση την πολικότητα, η οποία αποτελεί αιτία για περαιτέρω ανάπτυξη και σχηματισμό των τριών αξόνων. Η δημιουργία σωμιτών, οι οποίοι εμφανίζονται σε σειρά από το εμπρόσθιο προς το οπίσθιο μέρος του κεφαλουραίου άξονα, επιμηκύνοντάς τον, αποτελεί το τελευταίο στάδιο [56].

Παρόλο που τα Gastruloids αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο, σε πρώτες μελέτες δείχθηκε ότι δεν υπάρχει απόλυτη αντιστοιχία με την εσωτερική οργάνωση των εμβρύων. Η χαμηλή οργάνωση των ιστών τους, πιθανόν να αποδίδεται στη μη ικανοποιητική μηχανική στήριξη και άλλους περιορισμούς από το περιβάλλον τους, γεγονός όμως που δεν αναιρεί τη σημαντικότητά τους στην μελέτη του προεμφυτευτικού σταδίου και της δημιουργία αξόνων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε μεγαλύτερος βαθμός ομοιότητας των Gastruloids, ποροερχόμενων από ESCs, με έμβρυα, σε σχέση με αυτά που δημιουργήθηκαν από iPSCs [49]. Σε επόμενη μελέτη σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση ανάμεσα σε Gastruloids και έμβρυα, παρόλο που δεν υπήρξε απόλυτη ομοιότητα, αυτή παρατηρήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό [56]. Επιπλέον, η κυτταρική παρουσία αξιολογήθηκε χωροχρονικά, υποδεικνύοντας παρόμοιους μηχανισμούς με αυτούς των εμβρύων [55]. Συμπερασματικά, απαιτείται περισσότερη διερεύνηση του τρόπου δημιουργίας των Gastruloids, καλύτερος πειραματικός σχεδιασμός και προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάστηκε σχετικά με τη μέθοδο αυτή είναι και αυτό της Βιοηθικής. Ο χαρακτηρισμός ‘τεχνητά’ έμβρυα εγείρει ηθικά διλήμματα και ‘παγίδες’, δημιουργώντας διαφωνίες στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με την ηθική του πειραματισμού πάνω σε κάτι που δυνητικά θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία οργανισμού. Από την άλλη πλευρά, εδώ και αρκετές δεκαετίες δεν υπάρχει σαφής ορισμός σχετικά με το έμβρυο και αν και μέχρι ποιο στάδιο θα πρέπει να επιτρέπονται τα πειράματα, γεγονός που προκαλεί μεγαλύτερη σύγχυση [50]. Επιπλέον, η νομοθεσία κάθε κράτους ορίζει διαφορετικά κριτήρια και θεσπίζει τους δικούς της κανόνες και επιτρεπτά όρια, με αποτέλεσμα να επικρατεί μια γενικότερη ασάφεια γύρω από το συγκεκριμένο αντικείμενο. Αποτελεί, λοιπόν, επιτακτική ανάγκη η θέσπιση νέων καθολικών κανόνων σχετικά με τον ορισμό του εμβρύου, τα επιτρεπτά χρονικά όρια, την έρευνα σε χιμαιρικούς οργανισμούς και την προέλευση των κυττάρων που χρησιμοποιούνται, ώστε η έρευνα σχετικά με τα Gastruloids να συνεχιστεί [57].

2.2 Διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων σε νανοϋλικά

Ως νανοϋλικά ορίζονται τα οργανικά ή ανόργανα υλικά τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν με την κλίμακα μέτρησης του νανομέτρου (nm). Ο όρος 'νανοτεχνλογία' καθιερώθηκε το 1974 στο Τόκιο από τον Norio Naniguchi. Η νέα επιστήμη της νανοτεχνολογίας παρουσίασε ραγδαία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια σε πολλούς κλάδους της επιστήμης [58]. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή τεχνιτών κατασκευών των υλικών στο επίπεδο του ατόμου ή του μορίου με ελεγχόμενο τρόπο και επιθυμητές ιδιότητες. Εξαιτίας του μεγέθους τους, τα νανοϋλικά διέπονται από νόμους της φυσικής διαφορετικούς από αυτούς του μακρόκοσμου. Υπακούν στις δυνάμεις Van Der Waals, οι οποίες είναι κυρίως υπεύθυνες για τις ιδιότητές τους. Στον πεδίο των βλαστικών κυττάρων αποτελούν μια υποσχόμενη μέθοδο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τεχνητά υποστρώματα για την καλλιέργεια ή διαφοροποίηση των κυττάρων παρέχοντας πολλά πλεονεκτήματα και υπερνικώντας προβλήματα των προηγούμενων τεχνικών.

Είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλον κατέχει καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων. Εκτός από τους υποστηρικτικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που βρίσκονται σε αυτό, κριτική είναι και η σύσταση των πρωτεϊνών και μορίων της εξωκυττάριας ύλης, καθώς και η δομή και ιδιότητες που της προσδίδουν. Επομένως, για την καλλιέργεια και διαφοροποίηση in vitro βλαστικών κυττάρων, γίνεται προσπάθεια εξομοίωσης των συνθηκών αυτών, ώστε τα κύτταρα να είναι ικανά να επιτελέσουν βασικές λειτουργίες. Για το λόγο αυτό έχει επιστρατευτεί η επιστήμη της νανοτεχνολογίας, σε μια προσπάθεια δημιουργίας υλικών-υποστρωμάτων, ικανών να μιμούνται τέτοιες συνθήκες. Τα υλικά που έχουν κατασκευαστεί μπορούν να επάγουν τον πολλαπλασιασμό ακόμα και τη διαφοροποίηση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς [59, 60].

Οι βασικές ιδιότητες που μιμούνται τα νανοϋλικά ευνοούν την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, επιτρέπουν τη μετακίνηση και ανταλλαγή ουσιών με το εξωκυττάριο περιβάλλον, ενώ δεν εμποδίζουν τη δημιουργία των απαραίτητων διακυτταρικών συνδέσεων και δεν περιορίζουν το σχήμα και μέγεθος του κυττάρου. Η ελεγχόμενη σύστασή τους είναι αυτή που τα καθιστά κατάλληλα για τη στοχευμένη διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών. Προσαρμογές των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, όπως η πυκνότητα, το μέγεθος των σωματιδίων, το ιξώδες ή η ρευστότητα, η υδροφοβικότητα ή υδροφιλικότητα είναι εφικτές και μπορούν να επηρεάσουν καθοριστικά την πορεία των κυττάρων. Απαραίτητη, τέλος, ιδιότητα είναι η βιοσυμβατότητα.

2.3.1. Είδη νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά διακρίνονται σε κατηγορίες σύμφωνα με τη σύστασή τους, τη μορφολογία ή τη συνδεσμολογία τους [61].

Σύμφωνα με τη σύστασή τους μπορούν να διαχωριστούν σε:

- Φυσικά, όπως το κολλαγόνο, η χιτοζάνη, το μετάξι και το άλας αλγινικού οξέος
- Συνθετικά, όπως τα Polyethylene glycol (PEG), Polylactic acid (PLA), Polylactic-co-glucolic acid (PLGA), Poly(L)lactic acid (PLLA) και Oligo(poly-ethylene glycol) fumarate (OPF)
- Μικτά, που αποτελούνται από συνδυασμούς φυσικών ή/και συνθετικών

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στερεή ή σε μορφή υδρογέλης, σε φύλλα ή σκόνη, με διαφορετικό αριθμό και μέγεθος πόρων κ.α. Επιπλέον σε στερεή μορφή μπορεί να εμφανίζουν διαστρωμάτωση, πυκνό ή χαλαρό πλέγμα ινών, ευθυγράμμιση ή τυχαία διάταξη.

Όλες αυτές οι ιδιότητες είναι υπεύθυνες για τα χημική σταθερότητα, το βαθμό ευκαμψίας/ακαμψίας, το βαθμό πυκνότητας και την ποιότητα των πόρων, τη βιοσυμβατότητα και βιοκατανομή, τη βιοαποικοδόμιση και την τοξικότητα. Για βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων, ανάλογα με τον επιθυμητό τύπο κυτταρικής διαφοροποίησης, χρησιμοποιείται συνδυασμός νανοϋλικών και παρατηρείται το συνεργηστικό φαινόμενο. Έτσι, το υλικό που προκύπτει, παρουσιάζει κάποια από τα χαρακτηριστικά του κάθε υλικού, καταλήγοντας σε ένα σύνολο χαρακτηριστικών κατάλληλων για τον εκάστοτε κυτταρικό πληθυσμό.

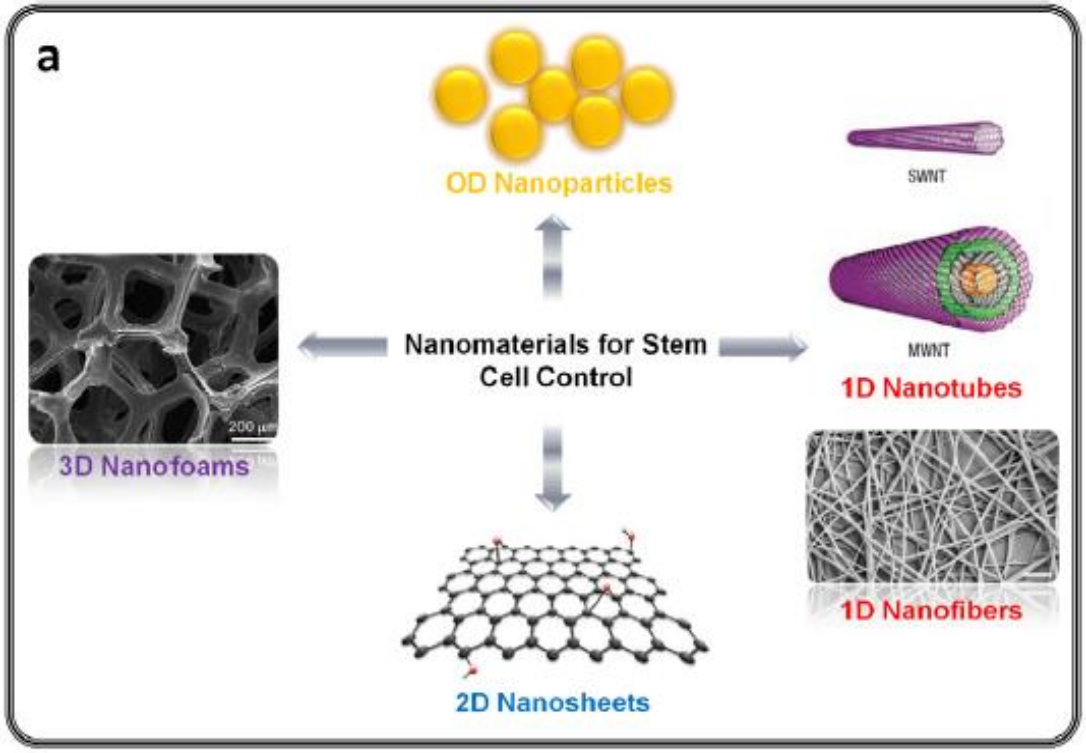
2.3.1.1. Γραφένιο

Το γραφένιο (G), ένα ευρέως διαδεδομένο νανοϋλικο, αποτελεί ένα αλλότροπο του άνθρακα. Απαρτίζεται από ένα μονοατομικό στρώμα δακτυλίων 6 ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν δυσδιάστατο κυψελοειδές πλέγμα. Το γραφένιο έχει τις εξής χαρακτηριστικές ιδιότητες, που το καθιστούν κατάλληλο για τη διαφοροποίηση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων :

- μεγάλη ειδική επιφάνεια

- εύρωστη χημεία επιφάνειας
- αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα
- εξαιρετική θερμική αγωγιμότητα
- απαράμιλλη μηχανική δύναμη

Οι ιδιότητες αυτές του προσδίδουν χημική και βιολογική λειτουργικότητα. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη δομή στο χώρο 'μηδενικής' διάστασης νανοσωματιδίων, μονοδιάστατων νανοϊνιδίων ή νανοσωληνίσκων, δύο διαστάσεων νανοφύλλων ή τρισδιάστατης αφρώδους μορφής.



Εικόνα 4. *Μορφές νανοϋλικών* (Kenry et al. 2018)

Κατόπιν χημικής επεξεργασίας δημιουργείται το Οξείδιο του γραφενίου (GO). Αποτελείται από φύλλα γραφενίου, πάχους 1 ατόμου, που περιέχουν άτομα Οξυγόνου (O) και Υδρογόνου (H), και χαρακτηρίζεται από ιδιότητες όμοιες με αυτές του γραφενίου και κάποιες νέες. Αυτές είναι η υδροφιλικότητα, η προστασία από Δραστικές Μορφές Οξυγόνου, με άμεση συνέπεια την αναστολή απόπτωσης των κυττάρων που παρατηρείται συχνά με το γραφένιο, και η αυξημένη ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών ορού εξαιτίας των δεσμών H, υδρόφιλων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [62].

Από πλευρά μοριακής ανάλυσης, το γραφένιο σχηματίζει ισχυρούς μη ομοιοπολικούς π-π δεσμούς που ευνοούν την προσκόλληση αυξητικών παραγόντων και τη μετουσίωση συγκεκριμένων ουσιών, όπως η ινσουλίνη. Αντίθετα, στο οξείδιο του γραφενίου, οι ισχυροί π-π δεσμοί και τα sp2 τροχιακά διασπώνται από τα μόρια οξυγόνου με αποτέλεσμα την ηλεκροστατική προσκόλληση πρωτεϊνών και αποφυγή της καταστροφής τους.

Συνδυασμοί γραφενίου ή του οξειδίου του με άλλα υλικά, όπως rGO-chitosan, OPF/ GO (Oligo(poly(ethylene glycol) fumarate), rGO-PCL (polyceprolactone) και φθοριωμένο GO, έχουν ως αποτέλεσμα συνεργηστικά φαινόμενα με βελτιστοποιημένα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και αυθόρμητη διαφοροποίηση των κυττάρων [63, 64]. Αναμφίβολα το γραφένιο, σε οποιαδήποτε από τις μορφές και σε οποιοδήποτε συνδυασμό του, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη στοχευμένη διαφοροποίηση in vitro πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων του ανάλογα με την διαφοροποίηση, τη μορφή που θα χρησιμοποιηθεί και τις αναλογίες ώστε αν αποφευχθούν αρνητικές συνέπειες, όπως η τοξικότητα.

2.3.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της διαφοροποίησης σε νανοϋλικά

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μια σχετικά νέα επιστήμη, εφαρμόσιμη σε πολλά πεδία της ιατρικής. Ιδιαίτερη χρησιμότητα φαίνεται να έχει στην αναγεννητική ιατρική, και συγκεκριμένα στις εφαρμογές στο χώρο των βλαστικών κυττάρων. Παρέχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους, διευκολύνοντας τον χειρισμό των ιδιαίτερων αυτών κυττάρων. Ιδιότητες όπως η μεγάλη ενέργεια επιφάνειας, μηχανικές, θερμικές και ηλεκτρομαγνητικές συμπεριφορές των υλικών μπορούν να αποβούν ευεργετικές τόσο στην καλλιέργεια όσο και τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Παρόλα αυτά οι πολυπαραγοντικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Τα νανοϋλικά φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη ευελιξία ως προς την κατασκευή και, κατά συνέπεια, τις ιδιότητές τους. Έτσι, προσαρμογές στο επιθυμητό μέγεθος και μορφή, τη σύσταση και τις ιδιότητες είναι εφικτές. Όμως, όπως και στα βιολογικά συστήματα, τροποποίηση μιας παραμέτρου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα επακόλουθες τροποποιήσεις άλλων ιδιοτήτων.

Η παραγωγή νανοϋλικών για καλλιέργειες κυττάρων αποτελεί πλέον μια απλή διαδικασία. Επιτρέπει την παραγωγή υλικών με προσαρμοσμένες ιδιότητες, σε μεγάλες ποσότητες, με χαμηλό κόστος και σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, ως

υποστρώματα κυττάρων, παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όπως ή ευκολία μεταφοράς, το χαμηλό κόστος συντήρησης και η μεγάλη διάρκεια ζωής, εφόσον δεν αποτελούνται από υποκυτταρικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες. Η επιφάνειά τους επιτρέπει την προσκόλληση των κυττάρων, χωρίς να περιορίζει το σχήμα τους. Οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις ευνοούνται, ενώ η μεταφορά ουσιών καθίσταται δυνατή κυρίως μέσω των πόρων του νανοϋλικού. Η επιφάνεια του υλικού συχνά καλύπτεται από χημικές ομάδες (-OH, -COOH κ.α.) που είναι συμβατές με τα κύτταρα και τις υποκυτταρικές ουσίες. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένα νανοϋλικά έχουν τη δυνατότητα να κατευθύνουν τη στοχευμένη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων.

Ωστόσο, η χρήση νανοϋλικών ενέχει σοβαρούς κινδύνους. Η συμβατότητά τους με τις κυτταρικές μεμβράνες είναι πιθανό να οδηγήσει στην αλληλεπίδραση με κυτταρικούς υποδοχείς και την πυροδότηση σηματοδοτικών μονοπατιών με άγνωστα αποτελέσματα. Εξαιτίας των χημικών ιδιοτήτων τους είναι πιθανό να προκαλέσουν τροποποίησεις σε πρωτείνες, όπως μετουσίωση, οξείδωση κ.α., επηρεάζοντας τη δράστηκότητά τους. Η ενδοκυττάρωση των νανοσωματιδίων αποτελεί έναν άλλον σημαντικό κίνδυνο. Νανοϋλικά μεγέθους μικρότερου των 50nm είναι ικανά να εισέρχονται στο κύτταρο. Οι επιπτώσεις του φαινομένου αυτού κάποιες φορές οδηγούν σε στοχευμένη διαφοροποίηση, όπως στην περίπτωση της οστεογένεσης, επηρεάζοντας το μέτρο ελαστικότητας/ακαμψίας του κυτταροσκελετού. Αντίθετα, άλλες φορές είναι πιθανό να αλληλεπιδράσουν με ουσίες του κυτταροπλάσματος ή κυτταρικά οργανίδια, με καταστρεπτικές για το κύτταρο επιπτώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διάρρηξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας σε καταστροφή της αναπνευστικής αλυσίδας και σηματοδοτώντας τον θάνατο του κυττάρου. Επιπλέον, συχνό φαινόμενο αποτελεί η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στο εξωκυττάριο περιβάλον, προκαλώντας φαινόμενα κυτταροτοξικότητας.

Παρά τους κινδύνους που κρύβει η χρήση των νανουλικών, αυτά αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στην καλλιέργεια και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό κρίνεται επιτακτική η ανάγκη διερεύνησης της δυναμικής και περίπλοκης αλληλεπίδρασής τους με τα κύτταρα. Εμβάθυνση στους κυτταρικούς μηχανισμούς και κατανόηση του ρόλου των νανοϋλικών σε αυτούς θα δώσει φως σε ανεπιθύμητες παρενέργειες οδηγώντας στην αποφυγή τους. Τέλος, εκτενής έρευνα και κατανόηση των πιθανών κινδύνων θα οδηγήσει σε αποφυγή τυχόν νομοθετικών και ηθικών περιορισμών [65].

2.4. Στοχευμένη διαφοροποίηση ES κυττάρων σε καρδιακούς ιστούς

Σύμφωνα με εμβρυολογικές μελέτες, η καρδία αποτελεί το πρώτο λειτουργικό όργανο του εμβρύου, και απαιτούνται περίπου 8 εβδομάδες για να αναπτυχθεί στον άνθρωπο [66]. Οι μηχανισμοί δημιουργίας της δεν είναι, ακόμη, πλήρως κατανοητοί. Ενώ στα πρώτα στάδια της ζωής παρατηρείται μια σχετική αναγεννητική δραστηριότητα, από το στάδιο της εφηβείας και μεταγενέστερα, το ποσοστό ανανέωσης του καρδιακού πληθυσμού μειώνεται περίπου στο 1% ετησίως, με φθίνουσα τάση κατά την πάροδο των χρόνων. Έτσι η συνολική αναγεννητική ικανότητα του καρδιακού μυός υπολογίζεται κατά προσέγγιση στο 45% [67]. Σε περιπτώσεις ασθένειας ή τραυματισμού, δεν παρατηρείται αναγέννηση των καρδιομυοκυττάρων, αντίθετα η θέση τους καταλαμβάνεται από ινοβλάστες και ουλώδη ιστό, λειτουργώντας ανασταλτικά στην ανάκτηση της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου [68]. Επιπλέον, παρατηρείται διπλασιασμός του DNA στα καρδιακά κύτταρα που όμως, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς, δεν οδηγεί σε κυτταρικό διπλασιασμό, αλλά σε φαινόμενα πολυπλοείδιας ή πολυπυρινικότητας, ενώ η αύξηση στο μέγεθος ολόκληρου του οργάνου, φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη αλλά και σε περιπτώσεις ασθενείας, αποδίδεται στην επακόλουθη αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και όχι του αριθμού τους [69, 70]. Τα φαινόμενα αυτά αποτελούν ένδειξη δύσκολα αναστρέψιμης διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Εξαιτίας του μειωμένου αναγεννητικού δυναμικού και της μεγάλης συχνότητας των καρδιακών παθήσεων, ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας εστιάζει στους πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρδιακή ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και στο μικροπεριβάλλον της καρδιάς.

Η επιστράτευση των Εμβρυονικών Βλαστικών κυττάρων, τα τελευταία χρόνια, αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των μηχανισμών και λειτουργειών των φυσιολογικών αλλά και παθολογικών καρδιακών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι δεν υπάρχουν κατάλληλα πειραματικά μοντέλα μελέτης των καρδιομυοκυττάρων και παρέχοντας το πλεονέκτημα της μη χρήσης πειραματικών ζωικών μοντέλων, η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών μπορεί να αποκαλύψει αναπτυξιακούς μηχανισμούς και εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, συμβάλλοντας στην κατανόηση των πρώιμων γεγονότων της καρδιογένεσης. Στο πεδίο της αναγεννητικής/επιδιορθωτικής καρδιολογίας, η ανακάλυψη μικρών σηματοδοτικών μορίων, με ρόλο στην επαγωγή της διαφοροποίησης των πρώιμων καρδιομυοκυττάρων, ίσως συμβάλλει στην πρώιμη αναγνώριση μη φυσιολογικών φαινοτύπων, την πρόληψη ασθενειών και την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. Επιπλέον, αποτελούν τα πλέον κατάλληλα μοντέλα μελέτης ανθρώπινων ασθενειών τόσο του καρδιαγγειακού συστήματος, όσο και της επίδρασης των ασθενειών άλλων συστημάτων στην καρδιά, ειδικότερα εάν πρόκειται για καρδιομυοκύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινες βλαστοκυτταρικές σειρές. Σημαντική είναι και η

συμβολή στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων, όπου μπορούν να ελεγχθούν για την αποτελεσματικότητα τους αρχικά, καθώς και για τοξικότητα και πιθανές ανεπιθύμητες παρενέργειες. Τέλος, η συμβολή τους στην ανακάλυψη ουσιών ικανών να ωθήσουν τη διαφοροποίηση ενδογενών βλαστοκυττάρων της καρδιάς ασθενών, θα έχει μεγάλο αντίκτυπο στην ανακάλυψη νέων θεραπειών κατά των καρδιακών παθήσεων.

Τα διαφοροποιημένα καρδιακά προερχόμενα από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα είναι επιδεκτικά σε όλους του τρόπους χειρισμού κ διαφοροποίησης που εφαρμόζονται στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, όπως περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα. Έτσι είναι εύκολο να παραχθούν μέσω αυθόρμητης διαφοροποίησης σε εναιώρημα Εμβρυοειδών Σωμάτων, σε συγκαλλιέργεια με βοηθητικά κύτταρα, καθώς και με στοχευμένη διαφοροποίηση με τη χρήση επιλεγμένων αυξητικών παραγόντων, ικανών να κατευθύνουν τη διαδικασία στον επιθυμητό κυτταρικό τύπο. Πρόσφατες μελέτες ερευνούν την πιθανότητα εκμετάλλευσης των ιδιοτήτων νανοϋλικών και χρήσης τους ως μέσα προγραμματισμού και κατεύθυνσης βλαστικών κυττάρων στο επιθυμητό κυτταρικό είδος. Άλλες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές παραγωγής καρδιομυοκυττάρων παρουσίασαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα εξαιτίας της περιορισμένης πλαστικότητάς τους με άμεση συνέπεια τη μειωμένη λειτουργικότητα, καθιστώντας τα ακατάλληλα ως μοντέλα [69].

Δύο από τα βασικά προβλήματα της χρήση διαφοροποιημένων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα, αποτελούν η καθαρότητα και η ωριμότητα των κυτταρικών πληθυσμών αυτών [71]. Αρχικά, αναφορικά με την καθαρότητα (Purity), είναι γνωστό ότι μια καρδιά ενός ενήλικου φυσιολογικού οργανισμού αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους σε διαφορετικές αναλογίες, με βασικούς τα καρδιομυοκύτταρα, κύτταρα λύου μυός των αγγείων και ενδοθηλιακά κύτταρα [69]. Επιπλέον, καρδιακοί ινοβλάστες, καρδιακά προγονικά κύτταρα, ενδογενή λεμφοκύτταρα καθώς και νευρώνες, σε μικρότερα ποσοστά, φαίνεται επίσης να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργεία του οργάνου, καθιστώντας περίπλοκη τη μελέτη της φυσιολογίας, των ηλεκτρικών κ χημικών ιδιοτήτων, των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, των μηχανισμών ανανέωσης του πληθυσμού κ.α. μέσω της χρήσης ενός μεμονομένου πληθυσμού in vitro, των καρδιομυοκυττάρων [72]. Τα ουδετερόφιλα, τέλος, φαίνονται να προσελκύουν το ενδιαφέρον τελευταία, όντας ο πρώτος κυτταρικός πληθυσμός που εγείρει αντιδράσεις φλεγμονής σε περιπτώσεις ασθένειας και κατά συνέπεια, που κατευθύνει την πορεία των επόμενων κυτταρικών αντιδράσεων [73]. Επιπλέον, προβληματισμούς εγείρει το γεγονός ότι τα καλλιεργούμενα και διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα παρουσιάζουν ίδιες ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες, ενώ στην πραγματικότητα, σε μια φυσιολογική καρδιά, αυτές διαφέρουν μεταξύ κομβικών, κολπικών και κοιλιακών κυττάρων με συνέπεια τα διαφορετικά δυναμικά μεμβράνης και τελικά τον διαφορετικό παλμό. Έτσι, δημιουργείται το ερώτημα σχετικά με το πόσο κατάλληλα μπορεί να είναι τα καρδιομυοκύτταρα με γενικευμένες ιδιότητες για τη μελέτη της

καρδιάς ως όργανο και επιπλέον τα αποτελέσματα που θα ληφθούν από αυτά, ποιάς υποκατηγορίας κυττάρων θα μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά [69].

Το δεύτερο πρόβλημα αφορά το βαθμό ωρίμανσης των κυττάρων που προκύπτουν (Maturity). Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα που προκύπτουν από in vitro διαφοροποίηση, δεν αποτελούν πλήρως διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα [69]. Για το γεγονός αυτό είναι πιθανό να ευθύνεται η μη αλληλεπίδραση με τους άλλους καρδιακούς κυτταρικούς πληθυσμούς, που μέσω της έκκρισης βιοενεργών μορίων, όπως αυξητικοί παράγοντες, παρακρινείς ορμόνες, κυτοκίνες και πεπτίδια, μπορούν να κατευθύνουν την κυτταρική ωρίμανση [71]. Όπως προαναφέρθηκε, και η δημιουργία ακυτταρικού Θώκου, με ιδιότητες ομοιάζοντες με του φυσιολογικού μικροπεριβάλλοντος, δεν έχει επιτευχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, ενισχύοντας το πρόβλημα της αποτυχίας πλήρους ωρίμανσης. Αποτέλεσμα, η διερώτηση για το αν τα κύτταρα αυτά μπορούν να αποτελέσουν μοντέλα τόσο για τη μελέτη ασθενειών, όσο και για την ανάπτυξη φαρμάκων. Μια άλλη πιθανή συνέπεια της μερικής ωριμότητας αποτελεί το ενδεχόμενο δημιουργίας τερατωμάτων εφόσον εισαχθούν σε ασθενή για θεραπευτικούς σκοπούς, δημιουργώντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα [74].

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.) συνοψίζονται τα απαραίτητα χαρακτηριστικά και ιδιότητες των ώριμων καρδιομυοκυττάρων, οι οποίες προσπαθούν να επιτευχθούν σε ικανοποιητικό βαθμό στα διαφοροποιημένα από βλαστικά κύτταρα, ώστε αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια για σκοπούς έρευνας, παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα.

Παρόλα τα αποτρεπτικά για τη χρήση των κυττάρων αυτών προβλήματα, τα καρδιομυοκύτταρα προερχόμενα από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα από τα λίγα μοντέλα για τη μελέτη των φυσιολογικών και παθολογικών καρδιακών γεγονότων με πολλές προοπτικές χρήσης. Οι προοπτικές αυτές εκτός των προαναφερθέντων, μελέτη φυσιολογικών και παθολογικών μηχανισμών, ανάπτυξη νέων φαρμάκων, τοξικολογικοί έλεγχοι κ.α., συμπεριλαμβάνουν και την απαραίτητη χρήση τους σε νέες σύγχρονες τεχνολογίες όπως η 3 διαστάσεων βιοεκτύπωση οργάνων ή τμημάτων αυτών, ως μοσχεύματα, η εποίκιση αποκυτταρωμένων οργάνων και η δημιουργία των `Organ-on-a-chip` τεχνολογιών, τόσο για μελέτες όσο και για θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως μεταμοσχεύσεις [66, 74]. Έτσι, περισσότερη έρευνα για τη βελτιστοποίηση των μεθόδων διαφοροποίησης και καλλιέργειας, ποσοτικός και χρονικός σχεδιασμός της χορήγησης των απαραίτητων παραγόντων, συγκεκριμένα για κάθε κυτταρικό υπότυπο, αλλά και ανάπτυξη περισσότερο συμβατού μικροπεριβάλλοντος, μπορούν να παρέχουν τα κατάλληλα εργαλεία, πλήρως διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα, που σε συνδυασμό με άλλες τεχνολογίες θα δώσουν λύσεις σε σοβαρά ιατρικά προβλήματα [75].

Characteristic	Features of mature cardiomyocytes	Maturation gene markers	Assessment
Morphology	↑ Length to width ratio (anisotropic)	–	Imaging; patch clamp
	Rod-shaped		
	↑ Cell size		
	↑ Membrane capacitance		
Electrophysiology	No spontaneous beating	–	Patch clamp; multielectrode array; in vivo arrhythmogenicity
	↑ Upstroke velocity	*SCN5A*	
	↓ Resting membrane potential (more negative)	*KCNJ2*	
	↑ Action potential duration	*CACNA1C*	
	Gap junctions and adhesive junctions polarized to intercalated discs	*GJA1*	
	↑ Conduction velocity	–	
Calcium handling	↑ Calcium stores in sarcoplasmic reticulum	*ATP2A2*, *CACNA1C*, *RYR2*, *SLC8A1*, *PLN*	Imaging using fluorescent calcium indicators
	↑ Calcium cycling and dynamics		
	↑ Calcium cycling with adrenergic stimulation		
	T-tubule development	*BIN1*, *JPH2*	WGA labelling, BIN1 and/or JPH2 immunostaining to assess structural features
Contractility	Organized sarcomeres	*MYH7* (in humans), *Myh6* (in rodents), *MYL2*, *TNNI3*	Isometric contractile force measurements (Frank–Starling relationship); traction force microscopy and/or tracking of cytoplasmic granules or sarcomeres (IonOptix); micropost deflection arrays
	↑ Contractile force		
	↑ Sarcomere length (from 1.8 μm (contracted) to 2.2 μm (relaxed))		
	↑ β-MHC to α-MHC ratio		
	Change from N2BA titin isoform to N2B titin		
	Switch from ssTnI to cTnI expression		
	PKA-mediated enhancement of contractility	*PLN*	Response to inotropic agents
Metabolism	↑ Fatty acid utilization	*CPT1B*	Mass spectrometry; nuclear magnetic resonance spectroscopy; oxygen consumption (metabolic flux assays)
	↑ Mitochondria number	*PGC1A*, *TFAM*	
Cell cycle	↓ Proliferation	–	Imaging DNA synthesis using BrdU or EdU labelling; Ki67, pH 3 or aurora B kinase immunostaining; live cell imaging for mitosis; isotope labelling for DNA synthesis; fluorescence intensity of DNA-binding dyes
	↑ Ploidy		

Πίνακας 1. *Χαρακτηριστικά ώριμου καρδιομυοκυττάρου.* (Karbassi, 2020)

2.4.1. Ο ρόλος γραφενίου στη διαφοροποίηση προς καρδιακούς ιστούς

Όπως αναφέρθηκε, η παραγωγή καρδιομυοκυττάρων με τη χρήση βλαστικών κυττάρων, κυρίως πολυδύναμων, αν και βρίσκεται σε πρώιμο ακόμη στάδιο, αποτελεί μια ελπιδοφόρα μέθοδο για τη μελέτη του οργάνου της καρδιάς, φυσιολογικής και παθολογικής. Στην προσπάθεια δημιουργίας του κατάλληλου Θώκου για την διαφοροποίηση προς καρδιακά κύτταρα, έρχεται να συμβάλλει τα τελευταία χρόνια η επιστήμη της νανοτεχνολογίας. Διάφορα είδη νανοϋλικών και σε διαφορετικές μορφές έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο για διαφοροποίηση προς άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όσο και για καρδιακούς [76]. Το γραφένιο και οι παραλλαγές του, πχ οξείδιο του γραφενίου, φαίνονται να μεσολαβούν στον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και στη διαφοροποίηση τους, παρέχοντας το κατάλληλο μικροπεριβάλλον, ενώ σε συγκεκριμένες περιπτώσεις η διαφοροποίηση φαίνεται προωθείται αποκλειστικά από το νανοϋλικό και σε συνθήκες έλλειψης σημαντικών για τη διαδικασία παραγόντων [60].

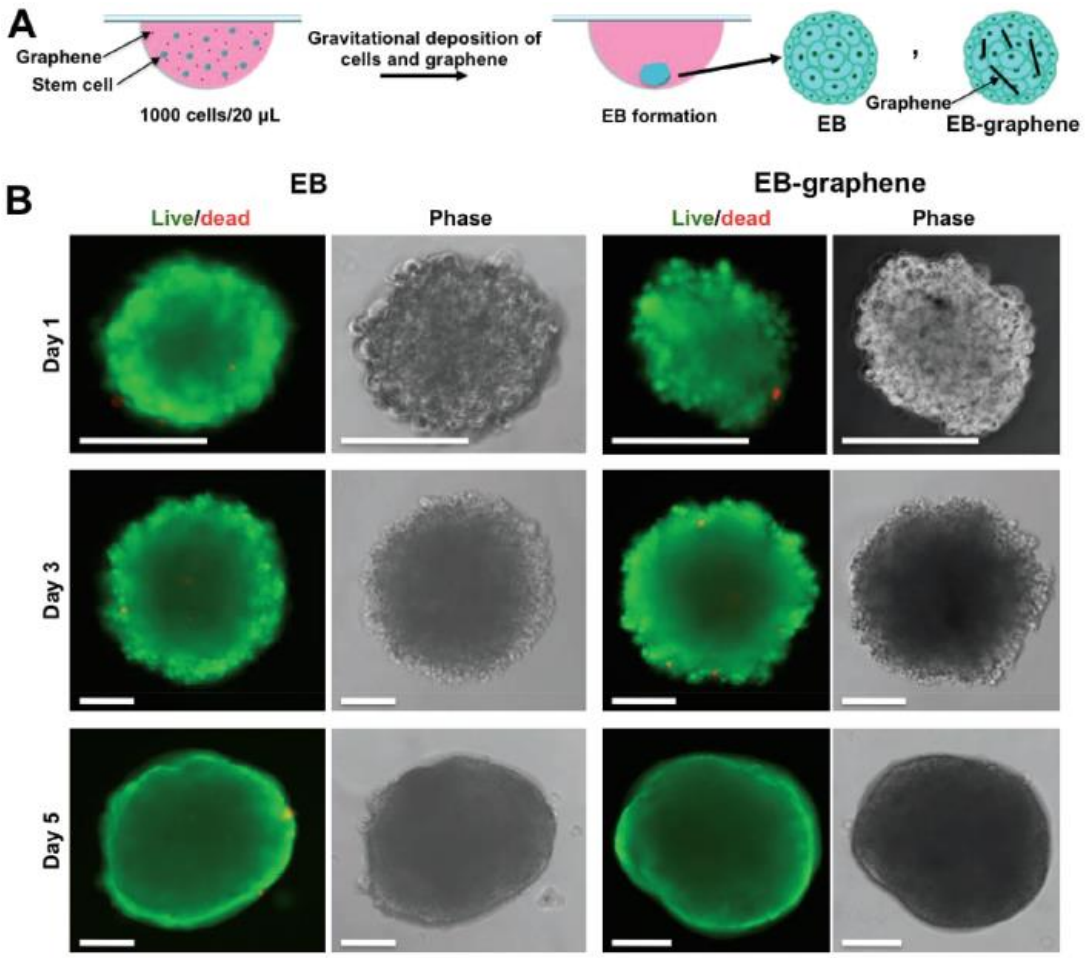
Αρχικά, έχει δειχθεί ότι το γραφένιο είναι ένα υλικό ιστοσυμβατό, που επιτρέπει την κυτταρική βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των εμβρυονικών αλλά και μεσεγχυματικού τύπου βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί, σε μορφή αφρού, στη διαφοροποίηση νευρώνων, μη επηρεάζοντας τους χασματικούς συνδέσμους (gap junctions), μέσω των οποίων πραγματοποιείται η διάδοση των ηλεκτρικών σημάτων [77]. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια σημαντική ένδειξη για τη χρήση του σε διαφοροποίηση προς καρδιακά κύτταρα, αφού αυτή δε θα περιορίσει τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες του. Επιπλέον, σε υπόστρωμα καλυμμένο με οξείδιο γραφενίου κατέστη δυνατή η διαφοροποίηση προς ενδοθήλιο, αναπόσπαστο τμήμα του καρδιακού ιστού [78].

Επιτυχημένες προσπάθειες διαφοροποίησης προς καρδιακά κύτταρα, με τη χρήση γραφενίου, κατάφεραν να επιβεβαιώσουν τη σημασία του για τους κυτταρικούς πληθυσμούς αυτούς. Συγκεκριμένα, δύο ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες, Ahadian et al. και Wang et al., το 2016 και 2017, αντίστοιχα, κατάφεραν να όχι μόνο να πετύχουν στοχευμένη διαφοροποίηση προς καρδιακούς ιστούς, αλλά και να αποδείξουν την υπεροχή αυτών σε σχέση με τα κύτταρα που παράγονται χωρίς το γραφένιο. Αξίζει να αναφερθούμε στα πειράματα αυτά με περισσότερη λεπτομέρεια ώστε να γίνει πλήρως κατανοητή η πορεία που ακολουθήθηκε.

Η πρώτη ομάδα, χρησιμοποιώντας φύλλα γραφενίου, κατάφερε να ενισχύσει τη διαφοροποίηση εμβρυοειδών σωμάτων, που παράχθηκαν με τη μέθοδο hanging drops, σε κύτταρα με ιδιότητες πιο κοντά στα ώριμα καρδιακά κύτταρα, περιορίζοντας παράλληλα, σημαντικά τους πρώιμους δείκτες καρδιογένεσης, χαρακτηριστικό των μέχρι τώρα παραγόμενων καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού. Τα φύλλα γραφενίου που χρησιμοποιήθηκαν παράχθηκαν με απλή και οικονομική μέθοδο από γραφίτη σε μορφή σκόνης, τα οποία ενσωματώθηκαν μέσα στις δομές των εμβρυοειδών σωμάτων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Τα κύτταρα στη συνεχεια εξετάστηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές για τις ιδιότητές τους. Βρέθηκε ότι εκτός της υψηλής βιωσιμότητας, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων με γραφένιο ήταν μειωμένος σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς γραφένιο που αποδίδεται στην αύξηση του ποσοστού διαφοροποίησης. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα των εμβρυοειδών σωμάτων εμφανίστηκε ανάλογη της συγκέντρωσης του γραφενίου, ενώ η παράμετρος Young's modulus, μέτρο ελαστικότητας, ήταν επίσης αυξημένη. Τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκαν από αυθόρμητη διαφοροποίηση των κυττάρων, χωρίς την προσθήκη κάποιου συγκεκριμένου παράγοντα.

Σε δεύτερη φάση του πειράματος, ελέγχθηκε η επίδραση ηλεκτρικής διέγερσης σε συνδυασμό με το γραφένιο, όπου δείχθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης δείκτη καρδιακής διαφοροποίησης, cTnT (cardiac troponin T), πλησίασε ποσοστό 96%, ενώ τα κύτταρα χωρίς γραφένιο μετά από ηλεκτρική διέγερση παρουσίασαν ποσοστά παρόμοια με αυτά των κυττάρων με γραφένιο απουσία ηλεκτρικής διέγερσης. Άλλοι καρδιακοί δείκτες ελέγχθηκαν, Actc1, Myh6, Myh7 και Tnnt2, επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα. Ο ρυθμός των συντονισμένων χτύπων (beating) καθώς και

οι περιοχές με χτύπων βρέθηκαν αυξημένοι στο συνδυασμό των μεθόδων. Τέλος τα καρδιομυοκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν, και μετά από έλεγχο των σαρκομερικών δομών τους, επιβεβαιώνοντας τη διατήρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους [79].



Εικόνα 5. *Διαφοροποίηση Εμβρυοειδών σωμάτων προς καρδιακά κύτταρα με τη χρήση γραφενίου.. Α. Σχηματική απεικόνιση. Β. Εικόνες μικροσκοπίου φθορισμού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές διαφοροποίησης.* (Ahadian, 2016)

Οι Wang et al., ένα χρόνο αργότερα, χρησιμοποίησαν επαγόμενα βλαστικά κύτταρα ανθρώπου υποδεικνύοντας μια απλή και γρήγορη μέθοδο δημιουργίας ώριμων καρδιομυοκυττάρων πάνω σε μονοστρωματικό φύλλο γραφενίου. Το υπόστρωμα γραφενίου ευνόησε τη βελτίωση του φαινοτύπου των καρδιομυοκυττάρων. Αυτό διαπιστώθηκε, εκτός από τον αυθόρμητο χτύπο, και από την άριστη έκφραση του δείκτη cTnT και της πρωτεΐνης, ενδεικτικής της συσταλτικότητας, α-actinin. Επιπλέον η μορφή των καρδιομυοκυττάρων εξετάστηκε, σημειώνοντας ποσοστό 60% ραβδόμορφων ώριμων κυττάρων. Τα διπύρηνα, πολυπύρηνα κύτταρα πλησίασαν αρκετά το ποσοστό αυτών που βρίσκονται φυσιολογικά και στην καρδιά και παρουσίασαν αυξημένη κυτταρική επιφάνεια. Το μήκος των σαρκομερών, η χωρική

οργάνωση καθώς και ο αριθμός των μυοϊνιδίων υπέδειξαν δομές όμοιες με ώριμου καρδιομυοκυττάρου. Το αυξημένο διακυτταρικό ενδοπλασματικό δίκτυο υποδείκνυε μια αυξημένη συσταλτικότητα και ενισχυμένες ιδιότητες χειρισμού του των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Τέλος η περιοχή που καταλαμβανόταν από τα μιτοχόνδρια παρουσιάστηκε εξαιρετικά αυξημένη, σε χρονικό διάστημα 3-4 εβδομάδων. Το αντίστοιχο χρονικό διάστημα για παρόμοια έκταση μιτοχονδρίων με τις παραδοσιακές μεθόδους είναι 3-4 μήνες, γεγονός που αποδεικνύει την επιταχυνόμενη διαφοροποίηση με τη συμβολή του γραφενίου.

Σχετικά με τις ηλεκροφυσιολογικές ιδιότητες δείχτηκε ότι το γαφένιο ενίσχυσε την ταχύτητα διάδοσης (conduction velocity) των ηλεκτρικών σημάτων μέσω της βελτίωσης της διακυτταρικής επικοινωνίας. Αυτό επιβεβαιώνεται με τον διπλασιασμό της έκφρασης της πρωτεΐνης Cx43 (Connexin 43), η οποία βοηθά στην πρόσφυση μεταξύ των κυττάρων και τη διάδοση των ηλεκτρικών παλμών, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Σε μεγαλύτερου εύρους διακυμάνσεις ασβεστίου (calcium transient) η απόκριση των κυττάρων με γραφένιο ήταν ισχυρότερη και συσχετίστηκε με αυξημένο ενδοπλασματικό δίκτυο και έκφραση των γονιδίων RyR και SERCA2α. Δραμματική αύξηση παρουσιάστηκε επίσης και στο μέγιστο εύρος αποπόλωσης. Τέλος δείχθηκε ότι η ηλεκροφυσιολογική ωρίμανση των κυττάρων είναι χρονοεξαρτώμενη [80].

3. Σκοπός

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια θεωρητική προσέγγιση της χρήσης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στο πεδίο της Αναγεννητικής Ιατρικής και της Μηχανικής Ιστών, καθώς και μια καταγραφή της μέχρι τώρα πορείας της έρευνας πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Στόχος της εργασίας είναι η εμβάθυνση στο πεδίο των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, και συγκεκριμένα η χρήση αυτών για τη δημιουργία κυττάρων των διάφορων καρδιακών ιστών, τόσο για ερευνητικές όσο και για θεραπευτικές ανάγκες, με τη τεχνική της στοχευμένης διαφοροποίησης. Η διαλεύκανση των δυνατών μεθόδων διαφοροποίησης επίσης καλύπτει μέρος του κειμένου, ενώ η περαιτέρω ανάλυση της χρήσης του γραφενίου, ως νανοϋλικό που επάγει τη στοχευμένη διαφοροποίηση σε καρδιακά κύτταρα, επισημαίνει τις πιθανές εφαρμογές του. Επιπλέον, διατυπώνονται πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης των κυττάρων αυτών, παράλληλα με την παράθεση των προκλήσεων και αναγκών στο πεδίο της σύγχρονης επιστήμης. Τελευταίο στόχο της εργασίας αυτής αποτέλεσε και η εισαγωγή και βασική εξοικείωση με το εργαστήριο των βλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιείται μια σύντομη περιγραφή των βασικών εργαστηριακών μεθόδων χειρισμού (καλλιέργειας και διαφοροποίησης) εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού, καθώς και των σχετικών απεικονιστικών τεχνικών (ανοσοφθορισμός και ανοσοϊστοχημική χρώση) που μπορούν να εφαρμοστούν για τη διαπίστωση της διαφοροποίησης.

4. Πειραματικές μέθοδοι και Υλικά

Οι εργαστηριακές μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν ή παρακολουθήθηκαν, για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, με σκοπό την εκμάθηση των βασικών τεχνικών και πρωτοκόλλων χειρισμού των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι:

1. Απόψυξη εμβρυονικών κυτταρικών σειρών, αποθηκευμένων σε υγρό άζωτο και θερμοκρασία -196°C
2. Καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και διατήρηση βλαστικότητας με τη χρήση αυξητικών παραγόντων.
3. Ψύξη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, σε υγρό άζωτο και θερμοκρασία -196°C, με στόχο τη μακροπρόθεσμη αποθήκευσή τους.
4. Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιακά κύτταρα με τη χρήση

Οι απεικονιστικές τεχνικές είναι:

1. Ανοσοφθορισμός σε Embryoid Bodies
2. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυομονιμοποιημένους ιστούς

4.1. Χειρισμοί εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων

4.1.1. Απόψυξη εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -196°C . Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η βιωσιμότητά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα.

1. Από το δοχείο υγρού αζώτου επιλέγουμε το κρυοφιαλίδιο (cryogenic vial/tube) με την επιθυμητή κυτταρική σειρά και τοποθετούμε σε υδατόλουτρο στους 37°C. Ανακινούμε ήπια παράλληλα με την επιφάνεια του νερού.
2. Μόλις το διάλυμα ξεπαγώσει, το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται σε αποστειρωμένη με UV ακτινοβολία Απαγωγό Αερίων (Hood), αφαιρείται όλη η ποσότητα του και εισάγεται σε αποστειρωμένο Falcon με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό (37°C) και αναλογία 3:1 (θρεπτικό υλικό:αρχικό διάλυμα κυττάρων).
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά (1100rpm).
4. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με προσοχή με αναρρόφηση με τη χρήση κενού. Τα κύτταρα βρίσκονται στο ίζημα.
5. 1ml θρεπτικού υλικού προστίθεται στο Falcon και τα κύτταρα επαναιωρούνται με ήπια μηχανική δόνηση και στη συνέχεια με τη χρήση πιπέτας (αναρρόφηση-απομάκρυνση υγρού).
6. Το εναιώρημα κυττάρων μεταφέρεται σε τρυβλίο Petri* (60mm) που περιέχει 3ml θρεπτικού υλικού.
7. Προστίθενται β-μερκαπτοαιθανόλη (28μL) και ο παράγοντας Lif (Leukemia inhibitory factor) (4μL) για την αποφυγή της διαφοροποίησης των κυττάρων.
8. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση του τρυβλίου, για την επίτευξη της διασποράς των κυττάρων.
9. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο (Incubator), σε συνθήκες υγρασίας, 37°C και 5% CO_2, για την ανάπτυξη των κυττάρων.

*Το τρυβλίο αφήνεται προηγουμένως να επωαστεί με 1ml φιλτραρισμένης ζελατίνης για 20 λεπτά, ενώ η περίσσεια ζελατίνης αφαιρείται πριν τη χρήση. Η ζελατίνη έχει το ρόλο του εξωκυττάριου υποστρώματος βοηθώντας στην προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου.

4.1.2. Καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικων κυττάρων

- Συντήρηση κυττάρων:

Για την καλλιέργια των εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων απαιτείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού κάθε 24 ώρες. Συνιστώμενος είναι ο καθημερινός έλεγχος των κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου πριν από οποιονδήποτε χειρισμό. Έτσι διαπιστώνεται η σχετική βιωσιμότητα των κυττάρων, πιθανές διαφοροποιήσεις, μολύνσεις ή αποπτωτικά κύτταρα, καθώς παρέχεται και μια ενδεικτική εικόνα για τον αριθμό των κυττάρων. Οι συγκεκριμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν το μέγιστο βαθμό ανάπτυξης σε συνθήκες πληρότητας 40-50%, που αντιστοιχεί σε σε συγκέντρωση κυττάρων 4 x 10^6. Πληρότητα μικρότερη της 35-40% οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, ενώ μεγαλύτερη της τάξης του 70%, ενδεικτική για ανακαλλιέργεια των κυττάρων, οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και κυτταρικό θάνατο, επίσης. Η ανανέωση πραγματοποιείται αφαιρώντας το παλιο θρεπτικό υλικό, με προσεκτική αναρρόφηση με τη χρηση κενού, στην άκρη του τρυβλίου ώστε να μην επηρεαστούν τα κύτταρα, και επακόλουθη προσθήκη νέου (4mL, προθερμασμένο στους 37°C) μαζί με β-μερκαπτοαιθανόλη (28μL) και τον παράγοντα Lif (4μL). Συνιστάται ήπια κυκλική ανακίνηση. Στην συνέχεια το τρυβλίο επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο.

- Ανακαλλιέργια κυττάρων:

Ανα 2-3 μέρες ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται εμφανώς, ώστε για τη διατήρηση της βιωσιμότητας τους καθίσταται αναγκαία η ανακαλλιέργεια (Passaging), η αραίωση τους δηλαδή και μεταφορά σε νέο τρυβλίο. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Συνιστάται η ανανέωση του θρεπτικόυ 2-3 ώρες πριν την εκκίνηση της διαδικασίας.
2. Πλύση 2 διαδοχικές φορές με PBS (Phosphate-buffered saline) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων FBS (Fetal Bovine Serum) εμπεριέχονται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εξαιτίας της ανασταλτικής του δράσης ενάντια στη θρυψίνη.
3. Προσθήκη 1ml διαλύματος θρυψίνης* και επώαση για 2 λεπτά στον κλίβανο.
4. Τα κύτταρα επαναιωρούνται με τη χρήση πιπέτας και περιστρέφοντας πλάγια το τρυβλίο, για τη διασφάλιση της καταστροφής των κυτταρικών δεσμών προσκόλλησης.
5. Όλη η ποσότητα του εναιωρήματος μεταφέρεται σε Falcon που περιέχει θρεπτικό υλικό σε αναλογία 3:1 (θρεπτικό υλικό: διάλυμα θρυψίνης). Η αραίωση της θρυψίνης στο FBS του θρεπτικού μέσου αναστέλλει την τοξική δράση της προς τα κύτταρα.

6. Μικρή ποσότητα εναιωρήματος συλλέγεται από το Falcon για απευθείας μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο, κατάλληλο μόνο για κύτταρα σε εναιωρήμα (suspension cells).
7. Παράλληλα το υπόλοιπο εναιώρημα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά (1100 rpm).
8. Με κατάλληλους υπολογισμούς επιλέγεται ο επιθυμητός βαθμός αραίωσης των κυττάρων (συνήθως 1:2, 1:3 ή 1:4), και κατά συνέπεια ο αριθμός νέων τρυβλίων, που επωάζονται με ζελατίνη όπως προηγουμένως, και προετοιμάζονται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας (προθερμασμένου) θρεπτικού υλικού (επιθυμητός τελικός όγκος 4mL).
9. Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται, κατάλληλη ποσότητα (προθερμασμένου) μείγματος θρεπτικού GMEM (Glassgow modified Eagle's medium, Gibco™, Thermo Fisher) προστίθεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με διαδικασία όμοια της απόψυξης.
10. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται στα τρυβλία, στα οποία προστίθενται β-μερκαπτοαιθανόλη (28μL) και ο παράγοντας Lif (4μL).
11. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση για ομοιοκατανομή των κυττάρων και τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο.

*Η θρυψίνη αποτελεί ένα είδος πεπτιδάσης, ικανό να διασπά τις (δια)κυτταρικές συνδέσεις, ευνοώντας την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα και την καταστροφή των συσσωματωμάτων οδηγώντας σε μονήρη κύτταρα. Παρατεταμένη επαφή της με τα κύτταρα έχει αποπτωτική δράση.

4.1.3. Ψύξη και κρυοσυντήρηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Η κρυοσυντήρηση εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο αποθήκευσης αυτών των κυττάρων, αφού είναι εφικτή για χρόνια, διασφαλίζοντας παράλληλα τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τη δυνατότητα επαναφοράς τους. Τα κύτταρα βρίσκονται σε μια κατάσταση μειωμένης μεταβολικής δραστηριότητας που επιτυγχάνεται τόσο με τις εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες όσο και με τη χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών. Η ελεγχόμενη σταδιακή ψύξη που πραγματοποιείται, επιτρέπει τη διάχυση του νερού από το εσωτερικό του κυττάρου, με την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, και αποτρέποντας το σχηματισμό κρυστάλλων νερού που θα κατέστρεφαν τις κυτταρικές δομές. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Συνιστάται η ανανέωση του θρεπτικού 2-3 ώρες πριν την εκκίνηση της διαδικασίας.
2. Πλύση 2 διαδοχικές φορές με PBS (Phosphate-buffered saline) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων FBS (Fetal Bovine Serum) εμπεριέχονται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εξαιτίας της ανασταλτικής του δράσης ενάντια στη θρυψίνη.
3. Προσθήκη 1ml διαλύματος θρυψίνης και επώαση για 2 λεπτά στον κλίβανο.
4. Τα κύτταρα επαναιωρούνται με τη χρήση πιπέτας και περιστρέφοντας πλάγια το τρυβλίο, για τη διασφάλιση της καταστροφής των κυτταρικών δεσμών προσκόλλησης.
5. Όλη η ποσότητα του εναιωρήματος μεταφέρεται σε Falcon που περιέχει θρεπτικό υλικό σε αναλογία 3:1 (θρεπτικό υλικό: διάλυμα θρυψίνης).
6. Μικρή ποσότητα εναιωρήματος συλλέγεται από το Falcon για απευθείας μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο με το αιμοκυτταρόμετρο.
7. Παράλληλα το υπόλοιπο εναιώρημα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά (1100 rpm).
8. Το υπερκείμενο αφαιρείται και μετά από κατάλληλους υπολογισμούς με στόχο την τελική συγκέντρωση 4 x 10^6 κυττάρων/φιαλίδιο, προστίθεται στο ίζημα των κυττάρων ποσότητα θρεπτικού υλικού με 10 % διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO)*.
9. Ακολουθείται η διαδικασία ομογενοποίησης του ιζήματος και δημιουργία εναιωρήματος, με τη χρήση μηχανικών δονήσεων και της πιπέτας.
10. Κατάλληλη ποσότητα εναιωρήματος μεταφέρεται στο ειδικό κρυοφιαλίδιο (cryogenic vial/tube) που τοποθετείται για 24 ώρες στους -80°C, ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται σε δοχείο υγρού αζώτου.

* Το DMSO αποτελεί μια κρυοπροστατευτική ουσία για τα κύτταρα, ρυθμίζοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης τους και μειώνοντας το μεταβολισμό τους, σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Παρόλα αυτά, σε θερμοκρασία δωματίου η δράση του στα κύτταρα είναι τοξική, με αποτέλεσμα οι γρήγοροι χειρισμοί να είναι αναγκαίοι.

4.1.4. Διαφοροποίηση εμβρϋονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιακά κύτταρα με τη μέθοδο μαζικής καλλιέργιας

Για τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλασικών κυττάρων προς καρδιακούς ιστούς χρησιμοποιόυνται κύτταρα απο καλλιέργεια, όπως περιγραφηκε. Τα κύτταρα αφήνονται για διάστημα 48 ωρών χωρίς αλλαγή του θρεπτικού μέσου, ενώ στη συνέχεια ακολοθυείται η εξής διαδικασία:

12. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Συνιστάται η ανανέωση του θρεπτικόυ 2-3 ώρες πριν την εκκίνηση της διαδικασίας.
13. Πλύση 2 διαδοχικές φορές με PBS (Phosphate-buffered saline) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων FBS (Fetal Bovine Serum) εμπεριέχονται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εξαιτίας της ανασταλτικής του δράσης ενάντια στη θρυψίνη.
14. Προσθήκη 1ml διαλύματος θρυψίνης* και επώαση για 2 λεπτά στον κλίβανο.
15. Τα κύτταρα επαναιωρούνται με τη χρήση πιπέτας και περιστρέφοντας πλάγια το τρυβλίο, για τη διασφάλιση της καταστροφής των κυτταρικών δεσμών προσκόλλησης.
16. Όλη η ποσότητα του εναιωρήματος μεταφέρεται σε Falcon που περιέχει θρεπτικό υλικό σε αναλογία 3:1 (θρεπτικό υλικό: διάλυμα θρυψίνης). Η αραίωση της θρυψίνης στο FBS του θρεπτικού μέσου αναστέλλει την τοξική δράση της προς τα κύτταρα.
17. Μικρή ποσότητα εναιωρήματος συλλέγεται από το Falcon για απευθείας μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο, κατάλληλο μόνο για κύτταρα σε εναιωρήμα (suspension cells).
18. Παράλληλα το υπόλοιπο εναιώρημα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά (1100 rpm).
19. Με κατάλληλους υπολογισμούς επιλέγεται ο επιθυμητός βαθμός αραίωσης των κυττάρων (συνήθως 1:2), και κατά συνέπεια ο αριθμός νέων τρυβλίων, που επωάζονται με ζελατίνη όπως προηγουμένως, και προετοιμάζονται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας (προθερμασμένου) θρεπτικού υλικού (επιθυμητός τελικός όγκος 4mL).
20. Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται, κατάλληλη ποσότητα (προθερμασμένου) μείγματος θρεπτικού IMDM (Iscove′s Modified Dulbecco′s Medium, Gibco™, Thermo Fisher) προστίθεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με διαδικασία όμοια της απόψυξης.
21. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται στα τρυβλία, στα οποία προστίθενται 5ng/mL VEGF, 30ng/mL bFGFF, 5μg/mL ασκορβικό οξύ.
22. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση για ομοιοκατανομή των κυττάρων και τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο.

4.2. Αποκονιστικές τεχνικές

4.2.1. Ανοσοφθορισμός σε Embryoid Bodies

1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό.
2. Κάνουμε 3 πλύσεις με PBS 1x (200-300μlL).
3. Προσθέτουμε φορμαλδεύδη (>300μL) για 15’-20’.(Στα ESs 10’)
4. Κάνουμε 2 πλύσεις με PBS 1x (200-300μlL), στο πλάι για να μην ξεκολλήσουν
5. Καθαρίζουμε το καινούργιο 24-well και προσθέτουμε PBS 1x (200-300μL).
6. Μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες στο καινούργιο 24-well.
7. Πετάμε το PBS 1x (3η πλύση) και προσθέτουμε TritonX100 0,2% (blocking) (200μL) για 20’-25’-30’* πάνω σε πάγο.
8. Αντικαθιστούμε το TritonX100 0,2% με TritonX100 0,5% (200μL) για 15’-20’* πάνω σε πάγο.
9. Βγάζουμε και στεγνώνουμε πλάγια σε χαρτί τις καλυπτρίδες.
10. Τοποθετούμε τις καλυπτρίδες σε τζαμάκι με φύλλο παραφίνης.
11. Προσθέτουμε 20μL δ/τος του 1ογενούς αντισώματος (συνήθως 2 αντισώματα μαζί).
12. Τοποθετούμε το τζαμάκι σε μπολ με υγρασία (με βρεγμένο χαρτί) και αφήνουμε “overnight” (~16h).
13. Μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε 24-well με PBS 1x (200-300μL) και κάνουμε πλύσεις με PBS 1x (200-300μlL) για μία ώρα (~5 πλύσεις, ανα 10’).
14. Στεγνώνουμε τις καλυπτρίδες πλάγια σε χαρτί, τοποθετούμε σε τζαμάκι με φύλλο παραφίνης και προσθέτουμε 20μL δ/τος του 2ογενούς αντισώματος.
15. Αφήνουμε για 1h σε μπολ με υγρασία (με βρεγμένο χαρτί) σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε 24-well με PBS 1x (200-300μL) και κάνουμε πλύσεις με PBS 1x (200-300μL) για μία ώρα (~5 πλύσεις, ανα 10’).
17. Απομακρύνουμε το PBS και προσθέτουμε 200 μL DAPI για 15’-20’*, για χρώση των πυρήνων. (Στα ESs 10’)
18. Κάνουμε πλύσεις με PBS 1x για 15’ (3-4 πλύσεις ανα 5’).
19. Τοποθετούμε anti-fade σε σταγόνες των 6μL για κάθε καλυπτρίδα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
20. Στεγνώνουμε πλάγια σε χαρτί τις καλυπτρίδες και, αφού τις μεταφέρουμε ανάποδα στις σταγόνες anti-fade, πιέζουμε με χαρτί.
21. Παρατηρούμε σε μικροσκόπιο φθορισμού ή καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύουμε στο ψυγείο, στους -20°C.

4.2.2. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυομονιμοποιημένους ιστούς

1. Μεταφέρουμε τις αντικειμενοφόρους με τις τομές των ιστών, από τους -80ºC, στη μεθανόλη στους -20ºC για 10’.
2. Τοποθετούμε τις αντικειμενοφόρους σε δοχείο με PBS.
3. Ξεπλένουμε με PBS, για απομάκρυνση του OCT (Optimal Cutting Temperature, κρυοπροστατευτικό του ιστού), με πιπέτα και στεγνώνουμε προσεκτικά με χαρτί γύρω από τις τομές.
4. Σχεδιάζουμε το περίγραμμα των τομών με μαρκαδόρο (~7 φορές), για αποφυγή διαρροής των διαλυμάτων.
5. Βάζουμε blocking buffer 0,2% ώστε να καλυφθεί όλη η τομή και αφήνουμε για τουλάχιστον 10’.
6. Αφαιρούμε το blocking buffer 0,2% (με κενό) και αφήνουμε με blocking buffer 0,5% για 5’.
7. Αφαιρούμε το blocking buffer με κενό, προσθέτουμε αντίσωμα για 1 ώρα και αφήνουμε σε μπολ με υγρασία.
8. Κάνουμε 3 πλύσεις με blocking buffer 0,2% και αφήνουμε την τελευταία για 10’. Μεταξύ των πλύσεων απομακρύνουμε το δ/μα με κενό.
9. Επωάζουμε με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε μπολ με υγρασία.
10. Κάνουμε 3 πλύσεις με PBS ή blocking buffer 0,2%, απομακρύνοντας κάθε φορά με κενό.
11. Βάζουμε DAPI για χρώση των πυρήνων για 10’.
12. Κάνουμε 3 πλύσεις με PBS, απομακρύνοντας κάθε φορά με κενό.
13. (Εάν χρειαζόμαστε το φθορισμό για καιρό μονιμοποιούμε με δ/μα 3,7% φορμαλδεϋδης σε PBS για 10’. Post Fixation)
14. Κάνουμε μια πλύση με PBS και αφαιρούμε με κενό.
15. Τοποθετούμε anti-fade σε ποσότητα ανάλογη με το μέγεθος της τομής, σκεπάζουμε με καλυπτρίδα και πιέζουμε σταθερά. Καλύπτουμε περίγραμμα της καλυπτρίδας με βερνίκι.
16. Παρατηρούμε σε μικροσκόπιο φθορισμού ή καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύουμε στους -20ºC.
    - Για το blocking buffer 0,2%:
      Διαλύουμε 200μL TritonX 100 + 400μL gelatin σε PBS. Συνολικός όγκος δ/τος 10mL.
    - Για το blocking buffer 0,5%:
      Διαλύουμε 500μL TritonX 100 + 400μL gelatin σε PBS. Συνολικός όγκος δ/τος 10mL.

4.3. Υλικά

Η κυτταρική σειρά εμβρύονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες ονομάζεται E14T, και εκφράζει το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο GMEM (Glassgow modified Eagle's medium, Gibco™, Thermo Fisher), εμπλουτίζεται με 15% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco™, Thermo Fisher), 2mM L-γλουταμίνη, 0.1mM απαραίτητα αμινοξέα, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Για την αποθήκευση σε υγρό άζωτο χρησιμοποιείται ειδικό διάλυμα περιεκτικότητας 60 % GMEM (Glassgow modified Eagle's medium, Gibco™, Thermo Fisher), 30% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) και 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide).

Για τη διαφοροποίηση των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο IMDM (Iscove′s Modified Dulbecco′s Medium, Gibco™, Thermo Fisher) εμπλουτίζεται με 15% FBS, 450 mmol/L μονοθειογλυκερόλη, 5ng/mL VEGF, 30ng/mL bFGFF, 5μg/mL ασκορβικό οξύ, 2 mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Χρησιμοποιήθηκε PBS (Phosphate-buffered saline, Invitrogen) ως ρυθμιστικό διάλυμα για πλύσεις και αραιώσεις.

Το διάλυμα θρυψίνης 10x περιείχε θρυψίνη / EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid, Invitrogen) σε αναλογία 0,05% / 0,02% w/v αραιωμένο σε PBS.

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν προϊόντα παρασκευής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Χρησιμοποιήθηκε απαγωγός αερίων με λάμπα UV ακτινοβολίας (AURA 200 MAC, BioAir Instruments, HeraSafe^{TM}) και επωαστικός κλίβανος (Forma Scientific, CO2 Water-jacketed Incubator, HeraCellTM) .

Η παρατήρηση των κυττάρων μετά τις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο Olympus (BX50F4)

4.4. Χρήσιμες παρατηρήσεις

Στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο θα γίνει αναφορά σε μικρές αλλά σημαντικές παρατηρήσεις για την ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου βλαστικών κυττάρων και συγκεκριμένα εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την επιστήμη, παρόλα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία με αποτέλεσμα να απαιτούν ήπιους και προσεκτικούς χειρισμούς, καθημερινή ενασχόληση, σχολαστική καθαριότητα και αποστειρωμένο περιβάλλον. Εξαιτίας τα καταγωγής τους, προέρχονται από εμβρυϊκές βλαστοκύστες, διαφέρουν από άλλες κυτταρικές σειρές με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης και προσαρμογής στα διάφορα περιβάλλοντα, όπως για παράδειγμα καρκινικές κυτταρικές σειρές, ικανές να προσαρμοστούν και να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται, ακόμη και σε περιβάλλον περιορισμένων θρεπτικών πόρων.

Τα κύτταρα αυτά, όντας επιρρεπή σε μολύνσεις, επιβιώνουν μόνο σε αποστειρωμένες συνθήκες, καθιστώντας τη χρήση ακτινοβολίας UV αναπόσπαστο μέρος της προετοιμασίας του χώρου, τόσο στην απαγωγό αερίων, όσο και σε ολόκληρο το δωμάτιο εργασίας. Η εργαστηριακή ποδιά καθώς και τα διάφορα υλικά αναλώσιμα ή εργαλεία που χρησιμοποιούνται (π.χ. πιπέτες) που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να προορίζονται για αποκλειστική χρήση και να χρησιμοποιούνται κατόπιν αποστείρωσης. Ο επωαστικός κλίβανος, αυστηρά ρυθμισμένος στις κατάλληλες συνθήκες, συνιστάται να προορίζεται για αποκλειστική χρήση. Ότιδήποτε εισέρχεται στην απαγωγό αερίων θα πρέπει πρώτα να έχει αποστειρωθεί με 70% αλκοόλη. Διαρροές θρεπτικών θα πρέπει να απολυμαίνονται άμεσα, καθώς αποτελούν εστίες ανάπτυξης μικροοργανισμών. Σε περίπτωση υποψίας διαρροής κυττάρων η χρήση διαλύματος χλωρίνης κρίνεται απαραίτητη. Ο επωαστικός κλίβανος θα πρέπει να διατηρείται καθαρός και το νερό του υδατόλουτρου να αλλάζεται τακτικά, ενώ καθοριστικής σημασίας είναι και η χρήση αντιμυκητιακού διαλύματος.

Όσον αφορά το χειρισμό των κυττάρων, η χρήση των θρεπτικών και άλλων ουσιών θα πρέπει να είναι αποκλειστική. Τα δοχεία (Petri, Falcon) που περιέχουν τα κύτταρα, καθώς και αυτά με ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν σε αυτά, δεν πρέπει ποτέ να ανοίγονται εκτός του αποστειρωμένου περιβάλλοντος της απαγωγού αερίων, ώστε να μην έρχονται σε επαφή με μολυσματικούς παράγοντες του εξωτερικού περιβάλλοντος. Τα θρεπτικό υλικό τους πρέπει να αλλάζεται αυστηρά σε ημερήσια βάση, καθώς και η ανακαλλιέργεια να πραγματοποιείται ανά 2-3 μέρες. Είναι σημαντικός ο σωστός προγραμματισμός για την προετοιμασία των δοχείων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν, έτσι για παράδειγμα, κατά τις διαδικασίες απόψυξης ή ανακαλλιέργεις, εφόσον το διάλυμα ζελατίνης απαιτεί επώαση των τρυβλίων για 20 λεπτά, θα πρέπει να προγραμματίζεται πριν τα κύτταρα υποστούν οποιονδήποτε χειρισμό. Επιπλέον, ιδανική θερμοκρασία για τα κύτταρα αποτελούν οι 37°C, έτσι τα διάφορα υγρά, όπως θρεπτικά, PBS κτλ, πρέπει να παραμένουν για κάποιο χρονικό

διάστημα στο υδατόλουτρο πριν τη χρήση, για την αποφυγή πρόκλησης κυτταρικού στρες. Τέλος, η παραμονή τους εκτός επωαστικού κλιβάνου θα πρέπει να περιορίζεται στην αναγκαία, ενώ η αλληλεπίδρασή τους με τοξικές ουσίες, όπως θρυψίνη ή DMSO, θα πρέπει να είναι η ελάχιστη επαρκής όπως ορίζεται από το πρωτόκολλο.

Για τις απεικονιστικές τεχνικές, τόσο του ανοσοφθορισμού όσο και της ανοσοϊστοχημείας, τα καθορισμένα από το πρωτόκολλο χρονικά διαστήματα θα πρέπει να τηρούνται αυστηρώς. Κατά την αφαίρεση των διάφορων διαλυμάτων, οι διάφορες πιπέτες δε θα πρέπει να έρχονται σε επαφή με περιοχές της αντικειμενοφόρου πλάκας που περιέχουν κύτταρα, καθώς αυτά μπορούν εύκολα να αποκολληθούν. Τα διάφορα διαλύματα αραιωμένων αντισωμάτων θα πρέπει να παρασκευάζονται πριν τη χρήση τους και να διατηρούνται σε πάγο. Επιλέγουμε προσεκτικά τα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να μην υπάρξει πιθανότητα λάθος αλληλεπίδρασης των δευτερογενών με αυτά. Τέλος, η αποθήκευση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες των -20°C και χαμηλότερες, και πάντα στο σκοτάδι.

5. Συζήτηση

Η ραγδαία πρόοδος της επιστήμης τα τελευταία χρόνια καθώς και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών έχουν συμβάλλει στην εμφάνιση πολλών καινοτόμων ανακαλύψεων, αλλάζοντας ριζικά την έρευνα, τον τρόπο αντιμετώπισης ασθενειών και βελτιώνοντας τις συνθήκες διαβίωσης. Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις του προηγούμενου αιώνα, που αναπτύσσεται ραγδαία τα τελευταία χρόνια, αποτελούν και τα βλαστικά κύτταρα. Τα πρώτα χρόνια, η επιστήμη των βλαστικών κυττάρων αντιμετωπίστηκε με αρκετή επιφύλαξη, ενώ τα σενάρια της μαζικής κλωνοποίησης ανθρώπων, ως πειραματόζωα ή δότες οργάνων, άκμαζαν. Στη συνέχεια, παρουσιάστηκε μια αντιμετώπιση αυτών ως πανάκια. Οι τράπεζες βλαστικών κυττάρων άρχισαν να διαδίδονται ταχύτατα, ενώ επικρατούσε η άποψη ότι η λύση στην αντιμετώπιση των περισσότερων ασθενειών βρισκόταν στα βλαστικά κύτταρα. Σειρές πειραμάτων ξεκίνησαν με περιορισμένο έλεγχο, σε βαθμό που βασικά δικαιώματα άρχισαν να καταπατώνται.

Στο σημείο αυτό η αναστολή των πειραμάτων κρινόταν επιτακτική. Έτσι η επιστήμη της βιοηθικής κλήθηκε να περιορίσει την ασύστολη αυτή καταπάτηση των δικαιωμάτων των ζωντανών οργανισμών. Επήλθε τότε μια ‘σκοτεινή’ περίοδος στον τομέα των βλαστικών κυττάρων, όπου η έρευνα θεωρήθηκε παράνομη, ενώ σειρές πειραμάτων διεξαγόταν μυστικά. Για το λόγο αυτό, για μια χρονική περίοδο υπήρξε μειωμένη πρόοδος. Στη συνέχεια όμως, νέοι κανόνες και περιορισμοί θεσπίστηκαν, καθιστώντας και πάλι την έρευνα νόμιμη. Η ακμή των βλαστικών κυττάρων επανήλθε, φέρνοντας σημαντικές πληροφορίες στο φως, με βασικό επωφελούμενο αρχικά την εμβρυολογία. Η κατανόηση μηχανισμών οργανογένεσης και ανανέωσης του κυτταρικού πληθυσμού ακολούθησαν. Οι τεχνικές χειρισμού των κυττάρων βελτιστοποιήθηκαν, επιφέροντας μεγαλύτερη και ταχύτερη πρόοδο. Στο σημείο αυτό τεχνικές των βλαστικών κυττάρων άρχισαν να συνδυάζονται με άλλες επιστήμες, όπως η 3D βιοεκτύπωση, καταλήγοντας σε πρωτοπόρα επιτεύγματα. Τέλος, συνδυασμός με άλλες επιστήμες επήλθε, δημιουργώντας νέες προοπτικές για τη χρήση των βλαστικών κυττάρων. Μια από αυτές αποστέλλεσαι η επιστήμη της νανοτεχνολογίας.

Ένα από τα άλυτα προβλήματα της σύγχρονης Ιατρικής, και συγκεκριμένα της καρδιολογίας, αποτελούν τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα τελευταία, φαίνονται να επηρεάζουν την ποιότητα ζωής αλλά και τη βιωσιμότητα μεγάλου μέρους του πληθυσμού. Επιπλέον ο σύγχρονος τρόπος ζωής δείχνει να επιδρά αρνητικά σε αυτά, επιδεινώνοντας το πρόβλημα. Θεραπεία των καρδιακής φύσεων ασθενειών δεν έχει βρεθεί, ενώ η αγωγή που παρέχεται στους νοσούντες είναι συμπτωματική, προσφέροντας μεν μια καλή ποιότητα ζωής στους ασθενείς, χωρίς όμως τη δυνατότητα οριστικής ίασης της ασθένειας. Η καρδιά αποτελεί ένα όργανο επαρκώς μελετημένο, παρόλα αυτά, λόγω της ανικανότητας ανάπλασης και ανανέωσης της δεν

έχουν βρεθεί ακόμη οι κατάλληλες φαρμακευτικές αγωγές. Ένας άλλος αρνητικός παράγοντας είναι και η αδυναμία παροχής ιστών ή κυττάρων του οργάνου ώστε να χρησιμοποιηθούν στην έρευνα. Συνέπεια αυτού, οι συνεχείς προσπάθειες για μια διαφορετική προσέγγιση του προβλήματος και η εύρεση εναλλακτικών μεθόδων παροχής ιστών και κυττάρων προς μελέτη.

Μια πολλά υποσχόμενη λύση αποτελούν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν σχετικά εύκολα να διαφοροποιηθούν σε καρδιακού τύπου κύτταρα. Έτσι, παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης των καρδιοκυττάρων, χωρίς να πρέπει να ληφθούν από υγιή ή ασθενή άτομα. Επιπλέον, εξετάζεται και το ενδεχόμενο θεραπευτικής χρήσης τους, σε παθολογικές καρδίες που αδυνατούν να ανανεώσουν τους νοσούντες ή κατεστραμένους ιστούς τους. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα που προκύπτουν από τις διαφοροποιήσεις, ενώ αποτελούν σχετικά ικανοποιητικά μοντέλα μελέτης της καρδιογένεσης, αδυνατούν να παρέχουν επαρκή μοντέλα ασθενειών και να προβλέψουν την ακριβή πορεία τους ή την έκβαση μιας πιθανής θεραπείας. Ένας βασικός λόγος, είναι το γεγονός ότι τα διαφοροποιημένα καρδιακά κύτταρα, αδυνατούν να επέλθουν στον τελικό βαθμό ωρίμανσης που παρατηρείται σε μια ενήλικη καρδιά, με άμεση συνέπεια τη διαφορετική απόκριση σε παράγοντες. Ένα άλλο πρόβλημα είναι η μικρή χρονική διάρκεια βιωσιμότητας των κυττάρων αυτών σε καλλιέργειες, ενώ οι περισσότερες καρδιακές παθήσεις είναι αρκετά χρονοβόρες, αδυνατώντας να παρέχουν τα κατάλληλα μοντέλα.

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη της νανοτεχνολογίας έχει επιστρατευτεί, προσπαθώντας να υπερνικήσει τα υπάρχοντα προβλήματα. Διάφορα νανοϋλικά κατασκευάζονται και δοκιμάζονται για τη βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας και διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, προς διάφορους ιστούς, ανάμεσά τους και τους καρδιακούς. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η μέχρι τώρα έρευνα της χρήσης ενός πολλά υποσχόμενου να νανοϋλικού, για τη διευκόλυνση της διαφοροποίησης προς καρδιακούς ιστούς. Το γραφένιο, παρέχοντας το κατάλληλο μικροπεριβάλλον και ερεθίσματα στα κύτταρα φαίνεται να είναι ικανό να παράξει μεγαλύτερου βαθμού ωριμότητας καρδιακά κύτταρα, συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους, αλλά και με άλλα νανοϋλικά. Έχει δείχθηκε από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες και με διαφορετικούς τρόπους, ότι η χρήση του έχει ως συνέπεια τη βελτιστοποίηση των καρδιομυοκυττάρων, τα οποία φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιότητες ώριμων καρδιακών κυττάρων ανθρώπου, σε συντομότερα χρονικά διαστήματα. Συμπερασματικά, το γραφένιο φαίνεται να αποτελεί ένα καινοτόμο, υλικό συμβατό με τα καρδιακά κύτταρα, ικανό να διευκολύνει την ανάπτυξή και ωρίμανσή τους, που όμως βρίσκεται στα αρχικά στάδια μελέτης και για το λόγο αυτό περισσότερη έρευνα απαιτείται ώστε η χρήση του να καθιερωθεί στη στοχευμένη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλασικών κυττάρων.

6. Βιβλιογραφία

1. Evans, M., *Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(10): p. 680-6.
2. Kinoshita, M. and A. Smith, *Pluripotency Deconstructed.* Dev Growth Differ, 2018. **60**(1): p. 44-52.
3. Martello, G. and A. Smith, *The nature of embryonic stem cells.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 647-75.
4. Mason, C. and P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine.* Regen Med, 2008. **3**(1): p. 1-5.
5. Mahla, R.S., *Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics.* Int J Cell Biol, 2016. **2016**: p. 6940283.
6. Slack, J.M.W., *Stem cell*, in *Encyclopedia Britannica*. 2021.
7. Fortier, L.A., *Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications.* Vet Surg, 2005. **34**(5): p. 415-23.
8. Rao, M.S., *Stem Sense: A Proposal for the Classification of Stem Cells*, in *Stem Cells and Development*. 2004.
9. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
10. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
11. Verfaillie, C., *The undoing of differentiation by four defined factors: A big step forward towards generating patient specific pluripotent stem cells.* J Hepatol, 2008. **49**(5): p. 876-8.
12. Mohamadnejad, M. and E.S. Swenson, *Induced pluripotent cells mimicking human embryonic stem cells.* Arch Iran Med, 2008. **11**(1): p. 125-8.
13. Medvedev, S.P., A.I. Shevchenko, and S.M. Zakian, *Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine.* Acta Naturae, 2010. **2**(2): p. 18-28.
14. Romito, A. and G. Cobellis, *Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions.* Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 9451492.
15. Slack, J.M.W., *From egg to embryo : regional specification in early development*. 1991, Cambridge [England] ; New York : Cambridge University Press, 1991.
16. Smith, K.P., M.X. Luong, and G.S. Stein, *Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells.* J Cell Physiol, 2009. **220**(1): p. 21-9.
17. Nagy, A., et al., *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8424-8.
18. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.* Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
19. Lanza R. , A.A., ed. *Essentials of Stem Cell Biology*. 3rd ed. 2014, Academic Press.
20. Liu, X., et al., *Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells.* Cell Res, 2008. **18**(12): p. 1177-89.
21. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.* Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
22. Maherali, N., et al., *Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.* Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 55-70.

23. Meshorer, E. and T. Misteli, *Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 540-6.
24. Becker, K.A., et al., *Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase.* J Cell Physiol, 2006. **209**(3): p. 883-93.
25. Ghule, P.N., et al., *Cell cycle dependent phosphorylation and subnuclear organization of the histone gene regulator p220(NPAT) in human embryonic stem cells.* J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 9-17.
26. Ghule, P.N., et al., *Staged assembly of histone gene expression machinery at subnuclear foci in the abbreviated cell cycle of human embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 16964-9.
27. Nichols, C.R., et al., *Randomized comparison of cisplatin and etoposide and either bleomycin or ifosfamide in treatment of advanced disseminated germ cell tumors: an Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Cancer and Leukemia Group B Study.* J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1287-93.
28. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.* Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
29. Mitsui, K., et al., *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.* Cell, 2003. **113**(5): p. 631-42.
30. Azuara, V., et al., *Chromatin signatures of pluripotent cell lines.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 532-8.
31. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.* Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
32. Houbaviy, H.B., M.F. Murray, and P.A. Sharp, *Embryonic stem cell-specific MicroRNAs.* Dev Cell, 2003. **5**(2): p. 351-8.
33. Suh, M.R., et al., *Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs.* Dev Biol, 2004. **270**(2): p. 488-98.
34. Jones, D.L. and A.J. Wagers, *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 11-21.
35. Zhao, H. and Y. Jin, *Signaling networks in the control of pluripotency.* Curr Opin Genet Dev, 2017. **46**: p. 141-148.
36. Mabry, K.M., S.Z. Payne, and K.S. Anseth, *Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype.* Biomaterials, 2016. **74**: p. 31-41.
37. Mahmood, A., C. Napoli, and A. Aldahmash, *In vitro differentiation and maturation of human embryonic stem cell into multipotent cells.* Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 735420.
38. Bonnier, F., et al., *Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models.* Toxicol In Vitro, 2015. **29**(1): p. 124-31.
39. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-24.
40. Meyers, J., J. Craig, and D.J. Odde, *Potential for control of signaling pathways via cell size and shape.* Curr Biol, 2006. **16**(17): p. 1685-93.
41. Engler, A.J., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.* Cell, 2006. **126**(4): p. 677-89.
42. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 241-54.
43. Gilbert, P.M., et al., *Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.* Science, 2010. **329**(5995): p. 1078-81.
44. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(3): p. 211-24.

45. Branco, M.A., et al., *Transcriptomic analysis of 3D Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Faster Cardiomyocyte Maturation Compared to 2D Culture.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9229.
46. Jitcy Saji Joseph, S.T.M., Monde Ntwasa, *Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery*, in *Cell Culture*, R.A. Mehanna, Editor. 2018, IntechOpen.
47. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture.* Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
48. M., K.G., *In vitro differentiation of embryonic stem cells.* Current Opinion in Cell Biology, 1995. **7**(6): p. 862-869.
49. Beccari, L., et al., *Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids.* Nature, 2018. **562**(7726): p. 272-276.
50. Piotrowska, M., *Avoiding the potentiality trap: thinking about the moral status of synthetic embryos.* Monash Bioeth Rev, 2020. **38**(2): p. 166-180.
51. Simunovic, M. and A.H. Brivanlou, *Embryoids, organoids and gastruloids: new approaches to understanding embryogenesis.* Development, 2017. **144**(6): p. 976-985.
52. Deglincerti, A., et al., *Self-organization of human embryonic stem cells on micropatterns.* Nat Protoc, 2016. **11**(11): p. 2223-2232.
53. Warmflash, A., et al., *A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells.* Nat Methods, 2014. **11**(8): p. 847-54.
54. Ozair, M.Z., C. Kintner, and A.H. Brivanlou, *Neural induction and early patterning in vertebrates.* Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2013. **2**(4): p. 479-98.
55. Martyn, I., E.D. Siggia, and A.H. Brivanlou, *Mapping cell migrations and fates in a gastruloid model to the human primitive streak.* Development, 2019. **146**(17).
56. van den Brink, S.C., et al., *Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids.* Nature, 2020. **582**(7812): p. 405-409.
57. Munsie, M., I. Hyun, and J. Sugarman, *Ethical issues in human organoid and gastruloid research.* Development, 2017. **144**(6): p. 942-945.
58. Nunes D., P.A., Santos L., Barquinha P., Pereira L., Fortunado E., Martins R., *Metal Oxide Nanostructures Synthesis, Properties and Applications, A volume in Metal Oxides*. 2019, Elsevier.
59. Wang, Z., J. Ruan, and D. Cui, *Advances and prospect of nanotechnology in stem cells.* Nanoscale Res Lett, 2009. **4**(7): p. 593-605.
60. Wei, M., S. Li, and W. Le, *Nanomaterials modulate stem cell differentiation: biological interaction and underlying mechanisms.* J Nanobiotechnology, 2017. **15**(1): p. 75.
61. Hofmann, M.C., *Stem cells and nanomaterials.* Adv Exp Med Biol, 2014. **811**: p. 255-75.
62. Park, J. and M. Yan, *Covalent functionalization of graphene with reactive intermediates.* Acc Chem Res, 2013. **46**(1): p. 181-9.
63. Kenry, et al., *When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine.* Biomaterials, 2018. **155**: p. 236-250.
64. Zhou, J., et al., *Injectable OPF/graphene oxide hydrogels provide mechanical support and enhance cell electrical signaling after implantation into myocardial infarct.* Theranostics, 2018. **8**(12): p. 3317-3330.
65. Xu Zhou, L.Y., Chengzhou Wu, Cheng chen, Gaoxing Luo, Jun Deng, Zhengwei Mao *Recent review of the effect of nanomaterials on stem cells.* RSC Advances, 2018(32).
66. Devalla, H.D. and R. Passier, *Cardiac differentiation of pluripotent stem cells and implications for modeling the heart in health and disease.* Sci Transl Med, 2018. **10**(435).

67. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans.* Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
68. Cui, B., et al., *Heart Regeneration in Adult Mammals after Myocardial Damage.* Acta Cardiol Sin, 2018. **34**(2): p. 115-123.
69. Rajala, K., M. Pekkanen-Mattila, and K. Aalto-Setala, *Cardiac differentiation of pluripotent stem cells.* Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 383709.
70. Zhang, Y., J. Mignone, and W.R. MacLellan, *Cardiac Regeneration and Stem Cells.* Physiol Rev, 2015. **95**(4): p. 1189-204.
71. Leitolis, A., et al., *Cardiomyogenesis Modeling Using Pluripotent Stem Cells: The Role of Microenvironmental Signaling.* Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 164.
72. Quaife-Ryan, G.A., et al., *Multicellular Transcriptional Analysis of Mammalian Heart Regeneration.* Circulation, 2017. **136**(12): p. 1123-1139.
73. Silvestre-Roig, C., et al., *Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation.* Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(6): p. 327-340.
74. Braam, S.R., R. Passier, and C.L. Mummery, *Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in regenerative medicine and drug discovery.* Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(10): p. 536-45.
75. Birket, M.J. and C.L. Mummery, *Pluripotent stem cell derived cardiovascular progenitors--a developmental perspective.* Dev Biol, 2015. **400**(2): p. 169-79.
76. Amin, R.D., et al., *Nanomaterials for Cardiac Tissue Engineering.* Molecules, 2020. **25**(21).
77. Tasnim, N., et al., *The Efficacy of Graphene Foams for Culturing Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Dopaminergic Neurons.* Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 3410168.
78. Garcia-Alegria, E., et al., *Graphene Oxide promotes embryonic stem cell differentiation to haematopoietic lineage.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 25917.
79. Ahadian, S., et al., *Graphene induces spontaneous cardiac differentiation in embryoid bodies.* Nanoscale, 2016. **8**(13): p. 7075-84.
80. Wang, J., et al., *Graphene Sheet-Induced Global Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.* ACS Appl Mater Interfaces, 2017. **9**(31): p. 25929-25940.