



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΟΡΤΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

**ΜΑΡΙΑ ΧΡΥΣΟΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

*Καθηγήτρια Τσέζου Ασπασία  
Επ. Καθηγητής Δήμας Κωνσταντίνος  
Επ. Καθηγήτρια Τζέτη Μαρία*

**ΛΑΡΙΣΑ, 2015**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κα. Ασπασίας Τσέζου, Καθηγήτριας Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Της εκφράζω τις ευχαριστίες μου, για τη βοήθεια της στην κατανόηση του θέματος, καθώς επίσης και για την αδιάλειπτη διαθεσιμότητά της κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Την ευχαριστώ επίσης για την παραχώρηση της ερευνητικής υποδομής του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου διότι χωρίς αυτήν δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Δήμα, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και την κα. Μαρία Τζέτη, Επίκουρης Καθηγήτριας Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για το χρόνο τους και τη συμπαράστασή τους.

Ευχαριστώ επίσης την Εύη Μουρμούρα, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής, για την καθοδήγηση της και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις συμβουλές της, κατά την διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων που απαιτούσε η διπλωματική μου εργασία.

Ευχαριστώ τέλος, τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την ευχάριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
A.1.1 Αορτικό τοίχωμα .....	10
A.1.1.1 Ιστολογική δομή αορτικού τοιχώματος.....	11
A.1.2 Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα .....	12
A.1.3 Φαινοτυπική πλαστικότητα των SMCs .....	13
A.1.3.1 Φαινότυποι λείων μυϊκών κυττάρων .....	13
A.1.3.2 Φαινοτυπικοί δείκτες των SMCs.....	16
A.1.3.3 Ποικιλομορφία στην μορφολογία των SMCs .....	17
A.1.3.4 Ρύθμιση του φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων.....	21
A.1.3.5 Ο ρόλος των βιοχημικών παραγόντων στη ρύθμιση του φαινοτύπου.....	22
A.1.3.6 Ο ρόλος της εξωκυττάριας μάζας στη ρύθμιση του φαινοτύπου .....	24
A.1.3.7 Ο ρόλος των φυσικών παραγόντων στη ρύθμιση του φαινοτύπου .....	26
A.1.4 Αθηρωμάτωση.....	29
A.1.4.1 Αθηρωμάτωση και SMCs.....	29
A.1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	33
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
B.1.1 Συλλογή δειγμάτων .....	34
B.1.2 Καλλιέργεια φυσιολογικών λείων μυϊκών κυττάρων (HASMCs).....	34
B.1.3 Διαφοροποίηση HASMCs .....	35
B.1.4 Απομόνωση πρωτεΐνης από καλλιεργημένα HASMCs.....	35
B.1.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου – SDS .....	36
B.1.5.1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών .....	37
B.1.5.2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών.....	38
B.1.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot).....	38
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
Γ.1 Πρωτεϊνική έκφραση της $\alpha$ -SM σε καλλιεργημένα SMCs αορτής.....	41
Γ.2 Πρωτεϊνική έκφραση της βιμεντίνης σε καλλιεργημένα SMCs αορτής.....	42
Γ.3 Πρωτεϊνική έκφραση της οστεοποντίνης (OPN) σε καλλιεργημένα SMCs αορτής. ....	43
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αορτή και οι άλλες συστηματικές αρτηρίες έχουν παχιά τοιχώματα, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες ελαστικού ιστού και λείων μυϊκών ινών. Οι αρτηρίες του κυκλοφορικού συστήματος έχουν μεγάλη διάμετρο και χρησιμεύουν ως σωλήνες χαμηλής αντίστασης οι οποίοι άγουν αίμα στα διάφορα όργανα. Η δεύτερη σημαντικότερη λειτουργία τους, που σχετίζεται με την ελαστικότητά τους, είναι η ιδιότητά τους να ενεργούν ως μία «δεξαμενή πίεσης», για τη διατήρηση της αιματικής ροής σε όλους τους ιστούς κατά τη διάρκεια της διαστολής.

Το αορτικό τοίχωμα αποτελείται από τρία διαφορετικά στρώματα: τον έσω χιτώνα, τον μεσαίο χιτώνα και τον έξω χιτώνα. Ο έσω χιτώνας του αρτηριακού τοιχώματος αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία επενδύουν τον αυλό του αιμοφόρου αγγείου και παρέχουν μια απόλυτη λεία επιφάνεια για την ομαλή ροή του αίματος. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν παράγοντες απαραίτητους για τη σωστή λειτουργία της αιματικής ροής (όπως κολλαγόνο, υμενίνη, ενδοθηλίνη, μονοξειδίο του αζώτου, παράγοντας von Willebrand) και διαθέτουν συνδεδεμένα ένζυμα στη μεμβράνη τους, όπως το μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης. Στην εξωτερική πλευρά του έσω χιτώνα βρίσκεται η έσω ελαστική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από ελαστίνη και επιτρέπει τη διάχυση ουσιών από τον αυλό του αγγείου προς βαθύτερα στρώματα του αορτικού τοιχώματος για τη θρέψη των κυττάρων.

Ο μεσαίος χιτώνας αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells, SMCs), διάσπαρτες ελαστικές ίνες, ίνες κολλαγόνου τύπου III και πρωτεογλυκάνες. Η έξω ελαστική μεμβράνη διαχωρίζει τον μεσαίο από τον έξω χιτώνα. Ο έξω χιτώνας αποτελείται από ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου τύπου I και ελαστικές ίνες και καλύπτει τα αγγεία στην εξωτερική τους επιφάνεια.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η επιστημονική κοινότητα είχε στραφεί στη μελέτη της λειτουργίας των μακροφάγων, τα οποία συναντώνται στο αρτηριακό τοίχωμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τα τελευταία χρόνια όμως, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη διερεύνηση της λειτουργίας και του ρόλου των SMCs.

Τα αορτικά SMCs σε φυσιολογικές συνθήκες συναντώνται στον μεσαίο χιτώνα των αορτικών τοιχωμάτων. Κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση της διαμέτρου των αγγείων μέσω της αγγειοδιαστολής και αγγειοσυστολής και είναι οι κύριοι παραγωγοί εξωκυττάριας ουσίας στο αρτηριακό τοίχωμα. Επιπλέον, τα SMCs του αρτηριακού τοιχώματος παράγουν

κυτοκίνες όπως PDGF, TGF, IFN1, MCP-1, εκφράζουν μόρια σύνδεσης όπως VCAM-1, IAM-1, στα οποία μπορούν να μεταναστεύσουν και να συνδεθούν μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα και να προστατεύσουν τα παραπάνω κύτταρα από την απόπτωση.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε SMCs, που απομονώθηκαν από ανθρώπινες αρτηρίες, έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διακριτοί πληθυσμοί SMCs στο αρτηριακό τοίχωμα. Οι δύο πληθυσμοί έχουν μικρές διαφορές στην έκφραση δεικτών διαφοροποίησης αλλά παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική μορφολογία, διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης, διαφορετικό ρυθμό απόκρισης σε αυξητικούς παράγοντες, καθώς και διαφορετική ικανότητα συσσώρευσης λιπιδίων.

Οι παραπάνω έρευνες απέδειξαν ότι τα SMCs στο αορτικό τοίχωμα έχουν την ικανότητα να εναλλάσσουν το φαινότυπό τους, μέσα στα όρια ενός φαινοτυπικού φάσματος, με τον συσταλτικό και συνθετικό φαινότυπο να αποτελούν τους δύο ακραίους δυνατούς φαινοτύπους. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα SMCs που παρουσιάζουν τον συσταλτικό φαινότυπο εντοπίζονται στον εσωτερικό χιτώνα του τοιχώματος, έχουν ατρακτοειδές σχήμα, εμφανίζουν συσταλτικές ίνες και παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου εντοπίζονται στις παχύνσεις του εσωτερικού χιτώνα, έχουν ρομβοειδές σχήμα, εκφράζουν υποδοχείς για λιπιδιακή πρόσληψη, παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό οργανιδίων για πρωτεϊνσύνθεση καθώς και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού και παραγωγής εξωκυττάριας μάζας.

Σε μεταγενέστερες μελέτες έγινε αντιληπτό ότι σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αθηροσκλήρωση, τα SMCs του μεσαίου χιτώνα έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα και να μεταβάλλουν το φαινότυπό τους σε συνθετικό. Στη συνέχεια παρατηρείται συσσώρευση μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων στο σημείο της βλάβης και παραγωγή μορίων εξωκυττάριας ουσίας από τα SMCs. Τέλος, τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου συσσωρεύουν λιπίδια και εστέρες χοληστερόλης που έχει ως συνέπεια τη μετατροπή τους σε «αφρώδη» κύτταρα και το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.

Επιπλέον έρευνες που αφορούν την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά της χοληστερόλης έξω από τα κύτταρα, αποκάλυψαν ότι στα κύτταρα του συνθετικού φαινοτύπου υπολειτουργεί ο μηχανισμός ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα που απομονώθηκαν από αθηροσκληρωτικές αρτηρίες, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του μεταφορέα ABCA1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης στην απολιποπρωτεΐνη A1.

Επίσης, άλλες μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του ABCA1 στα SMCs του μεσαίου χιτώνα, αλλά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον έσω χιτώνα.

Μελέτες υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του φαινοτύπου των SMCs διαδραματίζει ο αυξητικός παράγοντας TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta). Ο TGF- $\beta$  είναι μία κυτταροκίνη που ενέχεται την ανάπτυξη και τη διατήρηση των αγγείων, ρυθμίζοντας την αύξηση, τη διαφοροποίηση και τη σύνθεση του εξωκυττάριας ουσίας στα ενδοθηλιακά κύτταρα και SMCs. Έρευνες υποστηρίζουν ότι ο TGF- $\beta$  επάγει το συσταλτικό φαινότυπο των SMCs, αυξάνοντας την έκφραση πρωτεϊνών-δεικτών χαρακτηριστικών του φαινοτύπου, μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Rho-ROCK καθώς επίσης και των σηματοδοτικών μορίων Smad2 και Smad3.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση του φαινοτύπου των SMCs σε συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες αορτικών SMCs που απομονώθηκαν από τη μεσαία στιβάδα αορτής, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν βρίσκονται σε καλλιέργεια παρουσιάζουν τον συνθετικό φαινότυπο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης παρουσία του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$ , ηπαρίνης και ορού βοός, με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου χρονικού διαστήματος κατά το οποίο τα SMCs μεταβάλουν τον φαινότυπό τους σε συσταλτικό. Τέλος, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση μορίων χαρακτηριστικών για τα SMCs όπως η  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM), η βιμεντίνη και η οστεοποντίνη, με σκοπό το χαρακτηρισμό του φαινοτύπου τους.

## ABSTRACT

Aorta and other cardiovascular system arteries are characterized by thick walls, which are synthesized by great amounts of elastic tissue and smooth muscle fibers. Circulatory system arteries have large diameter and are utilized as low resistance tubes, which lead blood flow to various organs. Another very crucial function, related to their elasticity, is the ability of arteries acting as a pressure pump for the conservation of blood perfusion of all tissues during the expansion phase.

Aorta wall consists of three different layers, namely *tunica intima*, *tunica media*, *tunica adventitia*. Tunica intima, as part of the artery wall, is composed of endothelial cells, which create an extremely smooth surface over the blood vessel lumen and provide a normal blood flow. Furthermore, endothelial cells normally secrete factors, such as collagen, hyaline, endothelin, nitrogen monoxide, von Willebrand factor, e.t.c., which are indispensable for proper blood flow. Additionally angiotensin-converting enzyme, among other enzymes, is bound over the endothelial cells membrane. Outside intima tunica, is located an inner elastic membrane, which consists mainly of elastine, allowing substances' diffusion from the blood vessel lumen to inner layers of aorta wall, to assist cell growth.

Tunica media is comprised by Smooth Muscle Cells, SMCs, dispersed elastic fibers, collagen fibers (type III) and proteoglycans. External elastic membrane separates tunica media from tunica adventitia. Finally, tunica adventitia is made of fibroblasts, collagen fibers (type I) and elastic fibers and covers externally the vessels.

During the last decades, scientific research has focused on the investigation of macrophages function. In pathological situations, macrophages are found at the aorta wall. Thus, many studies concentrate on the examination of the operation and the role of SMCs.

Under normal circumstances, aorta SMCs, are found at the tunica media. The main role of those cells is associated with the regulation of vessels diameter, via the mechanisms of vasoconstriction and vasodilatation. Also, SMCs are the main generators of extracellular matrix at the aorta wall and additionally produce cytokines, like PDGF, TGF, IFN1, MCP-1. In parallel, SMCs express some ligands, such as VCAM-1, ICAM-1, which play a role in migration location for monocytes and lymphocytes to bind and have self-protection from apoptosis.

Many studies have been performed on SMCs, isolated from human arteries, showing that there are two distinct populations of SMCs at the aorta wall. Despite the fact that these two groups show insignificant differences at the expression level of differentiation markers,

they exhibit different morphology, growth rate and response rate to various growth factors and also dissimilar ability in lipid accumulation.

The above mentioned studies, have demonstrated that SMCs of the aorta wall are capable to alternate their phenotype, in a specific phenotype range, between the outliers of contractile and synthetic phenotype. The SMCs that exhibit the contractile phenotype are usually found at the tunica intima, featuring characteristics like spindle shape, contractile fibers and they generally develop a decreased growth rate, migration and proliferation.

In contrast, SMCs with synthetic phenotype are located at the tunica intima thickenings and corrugations. These cells have rhomboid shape and upregulate receptors specialized to lipid intake. They contain an increased number of organelles, responsible for protein synthesis, growth, migration and proliferation rates and also an increased procreation rate of extracellular matrix.

Recent studies underline the fact that under pathological situations, like atherosclerosis, tunica media SMCs could migrate to tunica intima, transforming their phenotype into synthetic. Consequently, an accumulation of macrophages and T-lymphocytes is observed at the defect site with concurrent generation of extracellular matrix by SMCs. SMCs with a synthetic phenotype heap lipids and cholesterol esters and this characteristic turns SMCs into "foam" cells leading to atheromatous plaque formation.

Further studies focus on the expression of genes, which are responsible for cholesterol transport outside the cells. These researchers showed that SMCs with a synthetic phenotype confer an insufficient mechanism of reverse cholesterol transport. In particular, cells derived from atherosclerotic arteries downregulate transporter ABCA1, which is competent for the transport of phospholipids and cholesterol to apolipoprotein A1. Other studies supported the idea that there were increased expression levels of ABCA1 at SMCs of tunica media, while there were markedly reduced expression levels at SMCs of tunica intima.

Other scientific groups claim that TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) plays a crucial role in SMCs phenotype regulation. TGF- $\beta$  is a cytokine which is relevant to artery growth, setting straight endothelial and SMCs growth, differentiation and synthesis of extracellular matrix. Also, TGF- $\beta$  induces the development of SMCs synthetic phenotype, increasing the expression of some protein - markers, which are characteristic of this phenotype, via Rho-ROCK signaling pathway and signaling molecules Smad2 and Smad3 activation.

The aim of this study is the investigation of SMCs phenotype, in cell culture. In particular, primary aorta SMCs cultures were used for a series of experiments. These cells



were isolated from the tunica media and according to reliable references, they present a synthetic phenotype. Afterwards, SMCs were incubated in suitable differentiation medium, in the presence of TGF- $\beta$  growth factor, heparin and fetal bovine serum. The objective of this work was to find the time point at which, SMCs synthetic phenotype transforms into contractile phenotype. Finally, the expression levels of proteins, such as  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM), vimentin and osteopontin, were estimated, in order to achieve a full characterization their phenotype.

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A.1.1 Αορτικό τοίχωμα**

Η αορτή και οι άλλες αρτηρίες του κυκλοφορικού συστήματος έχουν παχιά τοιχώματα, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες ελαστικού ιστού και λείων μυϊκών ινών. Οι αρτηρίες έχουν μεγάλη διάμετρο και χρησιμεύουν ως σωλήνες χαμηλής αντίστασης, οι οποίοι άγουν το αίμα στα διάφορα όργανα. Μία δεύτερη και σημαντικότερη λειτουργία τους που σχετίζεται με την ελαστικότητά τους, είναι η ιδιότητά τους να ενεργούν ως μία «δεξαμενή πίεσης», για τη διατήρηση της αιματικής ροής σε όλους τους ιστούς κατά τη διάρκεια της διαστολής [Pugsley et al, 2000].

Τα αγγεία στην πλειοψηφία τους έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, εντούτοις παρατηρούνται ορισμένες διαφορές, οι οποίες αποτελούν και τη βάση για την κατάταξη των αγγείων σε συγκεκριμένες κατηγορίες. Για παράδειγμα, τα τοιχώματα των αγγείων που δέχονται πολύ υψηλές πιέσεις είναι παχύτερα από αυτά που μεταφέρουν αίμα με χαμηλή πίεση. Σε γενικές γραμμές, οι αρτηρίες διαθέτουν παχύτερο τοίχωμα και μικρότερη διάμετρο από τις αντίστοιχες φλέβες.

Το τοίχωμα των αγγείων σχηματίζεται από τρία βασικά δομικά συστατικά: τον έξω χιτώνα, τον μεσαίο χιτώνα και τον έσω χιτώνα. Η αναλογία και η οργάνωση των τριών αυτών στρωμάτων κατά μήκος του κυκλοφορικού συστήματος επηρεάζεται από μηχανικούς και μεταβολικούς παράγοντες, όπως η αρτηριακή πίεση και οι μεταβολικές ανάγκες των ιστών. Οι τρεις αυτοί χιτώνες, σε διαφορετικές αναλογίες, σχηματίζουν το τοίχωμα όλων των αγγείων, εκτός από αυτό των τριχοειδών και των μετατριχοειδών φλεβιδίων, των οποίων τα μόνα δομικά συστατικά είναι το ενδοθήλιο, ο βασικός υμένας του ενδοθηλίου και τα περικύτταρα.

Νευρικές απολήξεις που ελέγχονται από το συμπαθητικό κεντρικό νευρικό σύστημα συσφίγγουν τα αγγεία και έτσι ελέγχουν τη ροή του αίματος στις περιοχές που εξυπηρετούνται από την αρτηρία. Το μεσαίο στρώμα σε μικρότερες αρτηρίες είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου μυώδες και σε μεγαλύτερες αρτηρίες έχει περισσότερες ελαστικές ίνες. Το πάχος του εξωτερικού στρώματος ποικίλει ανάλογα με τη θέση της αρτηρίας. Σε προστατευμένες περιοχές, όπως οι κοιλιακές και κρανιακές κοιλότητες, το εξωτερικό στρώμα των αρτηριών είναι πολύ λεπτό, ενώ σε περισσότερο εκτεθειμένες τοποθεσίες, όπως στην περιοχή των άκρων, είναι πολύ παχύτερο.

#### A.1.1.1 Ιστολογική δομή αορτικού τοιχώματος

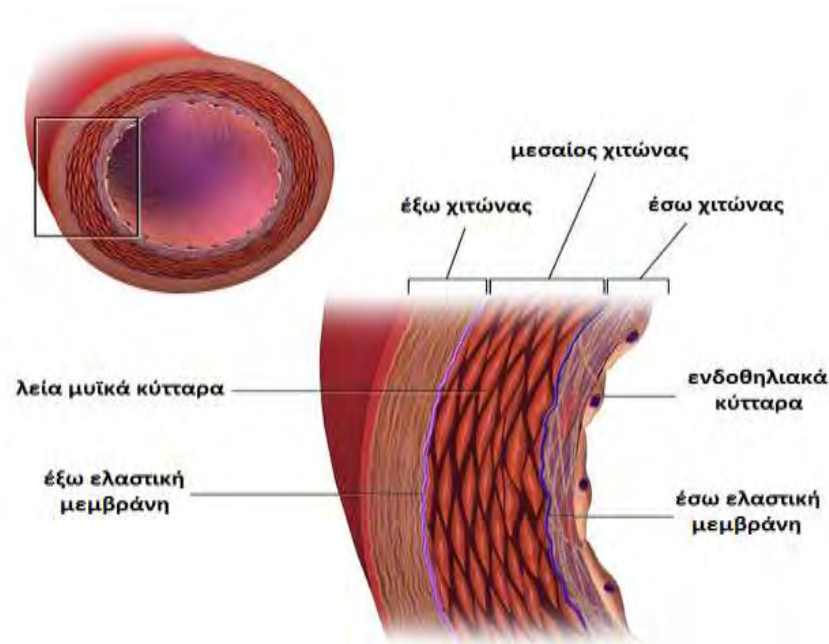
Το τοίχωμα της αορτής αποτελείται από τρεις διαφορετικούς χιτώνες (Εικόνα 1). Προς τον αυλό του αγγείου εντοπίζεται ο έσω χιτώνας (*tunica intima*). Ο έσω χιτώνας αποτελείται από μία μονή στιβάδα πεπλατυσμένων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν ένα σωλήνα που επενδύει τον αυλό του αγγείου, μαζί με τον υποκείμενο υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν παράγοντες απαραίτητους για τη σωστή λειτουργία της αιματικής ροής όπως το κολλαγόνο, η υμενίνη, η ενδοθελίνη, το μονοξειδίο του αζώτου και ο παράγοντας von Willebrand. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του έσω χιτώνα διαθέτουν συνδεδεμένα ένζυμα στη μεμβράνη τους όπως το μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης που διασπά την αγγειοτενσίνη I και τη μετατρέπει σε αγγειοτενσίνη II, καθώς και ένζυμα που απενεργοποιούν τη βραδυκινίνη, τη σεροτονίνη, προσταγλαδίνες, τη θρομβίνη και την νορεπινεφρίνη. Τέλος μπορούν να συνθέσουν την λιποπρωτεϊνική λιπάση, το ένζυμο που αποικοδομεί τις λιποπρωτεΐνες.

Επιπλέον κάτω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα εντοπίζεται η υποενδοθηλιακή στοιβάδα η οποία συνιστά μια πάχυνση του έσω και μεσαίου χιτώνα της αορτής. Η υποενδοθηλιακή στοιβάδα αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και λίγα διάσπαρτα SMCs, αποτελεί κυρίως χαρακτηριστικό του αορτικού τοιχώματος ενηλίκων και αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα παθολογικής αορτής, όπως της αθηρωματικής αορτής. Στην εξωτερική πλευρά του έσω χιτώνα βρίσκεται η έσω ελαστική μεμβράνη, που είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη στις μυϊκές αρτηρίες. Η έσω ελαστική μεμβράνη αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα ελαστίνης και χωρίζει τον έσω από τον μεσαίο χιτώνα της αορτής. Επίσης, επιτρέπει τη διάχυση ουσιών από τον αυλό του αγγείου προς βαθύτερα στρώματα του αορτικού τοιχώματος για τη θρέψη των κυττάρων.

Εξωτερικά του έσω χιτώνα εντοπίζεται ο μεσαίος αορτικός χιτώνας (*tunica media*) που αποτελεί το παχύτερο στρώμα του αιμοφόρου αγγείου. Οι στοιβάδες κυττάρων που σχηματίζουν το μεσαίο χιτώνα αποτελούνται κυρίως από ελικοειδώς διατεταγμένα SMCs, καθώς επίσης διάσπαρτα μεταξύ των στοιβάδων των SMCs βρίσκονται ελαστικές ίνες, ίνες κολλαγόνου τύπου III και πρωτεογλυκάνες. Η αορτή φέρει και έξω ελαστική μεμβράνη, που είναι λεπτότερη από την έσω ελαστική μεμβράνη και χωρίζει τον μεσαίο χιτώνα από τον υπερκείμενο έξω χιτώνα.

Ο έξω χιτώνας καλύπτει τα αγγεία στη εξωτερική τους επιφάνεια και αποτελείται κυρίως από ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου τύπου I και ελαστικές ίνες με επιμήκη

προσανατολισμό. Ο χιτώνας αυτός συνήθως συνέχεται με τα υπόλοιπα στοιχεία συνδετικού ιστού που περιβάλλουν το αγγείο.



**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του αρτηριακού τοιχώματος.

### **A.1.2 Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα**

Τα αγγειακά SMCs αποτελούν εξαιρετικά εξειδικευμένα κύτταρα, απαραίτητα για την καλή λειτουργία του αγγειακού συστήματος, με κύρια λειτουργία την συστολή και ρύθμιση της διαμέτρου της αορτής, της αρτηριακής πίεσης και της αιματικής ροής. Ωστόσο, τα αγγειακά SMCs ασκούν συγχρόνως και άλλες λειτουργίες, οι οποίες γίνονται σταδιακά πιο σημαντικές κατά την αγγειακή αναδιαμόρφωση σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η εγκυμοσύνη και η άσκηση, ή ακόμη και μετά από αγγειακό τραυματισμό. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα SMCs συνθέτουν μεγάλες ποσότητες συστατικών εξωκυττάριας μάζας, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός τους και η ικανότητά τους να μεταναστεύουν. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα SMCs είναι ικανά να ρυθμίζουν τη διάμετρο των αγγείων όχι μόνο βραχυπρόθεσμα, αλλά και την μακροπρόθεσμη προσαρμογή τους μέσω δομικής αναδιαμόρφωσης, μεταβάλλοντας τον αριθμό των κυττάρων και τη σύσταση του συνδετικού ιστού [Metz et al, 2012].

### **A.1.3 Φαινοτυπική πλαστικότητα των SMCs**

Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα SMCs χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη φαινοτυπική πλαστικότητα ως αποτέλεσμα των λειτουργιών που επιτελούν. Τα SMCs εκτελούν τόσο συσταλτικές, όσο και συνθετικές λειτουργίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αλλαγές στη μορφολογία, στα επίπεδα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης, καθώς και στην έκφραση διαφόρων πρωτεϊνικών δεικτών. Η φαινοτυπική ποικιλομορφία των SMCs που προκύπτει, φαίνεται να είναι μία συνάρτηση γενετικών παραγόντων και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν βιοχημικούς παράγοντες, όπως τα συστατικά της εξωκυττάριας μάζας, καθώς και φυσικούς παράγοντες όπως η επιμήκυνση και η τάση διάτμησης.

Λόγω της ποικιλομορφίας των SMCs, τα αγγεία επιτυγχάνουν την ευελιξία η οποία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική λειτουργία τους κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες.

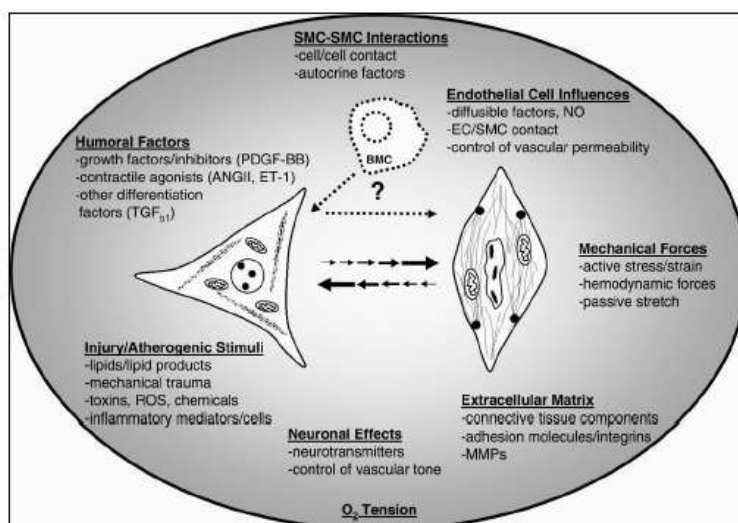
Η φαινοτυπική ποικιλομορφία των SMCs κατά ένα μέρος της μπορεί να εξηγηθεί από την διαφορετική εμβρυολογική προέλευση των κυττάρων αυτών [Gittenberger-de Groot et al, 1999]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα SMCs μπορεί να προέλθουν από διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων, πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών καθώς και μακροφάγων, ενώ τα SMCs που εντοπίζονται στο τοίχωμα της αορτής είναι κυρίως μεσεγχυματικής προέλευσης.

#### **A.1.3.1 Φαινότυποι λείων μυϊκών κυττάρων**

Οι διαφορετικές λειτουργίες, τις οποίες επιτελούν τα SMCs, έχουν συσχετιστεί με την ύπαρξη δύο διακριτών φαινοτύπων των συγκεκριμένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα SMCs εντοπίζονται στον συσταλτικό και στον συνθετικό φαινότυπο, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από διαφορές στην μορφολογία, τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών, το ρυθμό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα μετανάστευσης. Οι διαφορές αυτές είναι δυνατόν να χαρακτηρίζουν και SMCs που εντοπίζονται στο ίδιο αγγείο.

Τα SMCs του συσταλτικού φαινοτύπου εντοπίζονται στο μεσαίο χιτώνα της αορτής υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ο συσταλτικός φαινότυπος αποτελεί τον διαφοροποιημένο φαινότυπο των SMCs χαρακτηριστικό του οποίου είναι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών πρωτεϊνών των SMCs όπως η α-ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων (α-smooth muscle actin, α-SM), καθώς επίσης ο χαμηλός ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα SMCs έχουν τη δυνατότητα να υφίστανται

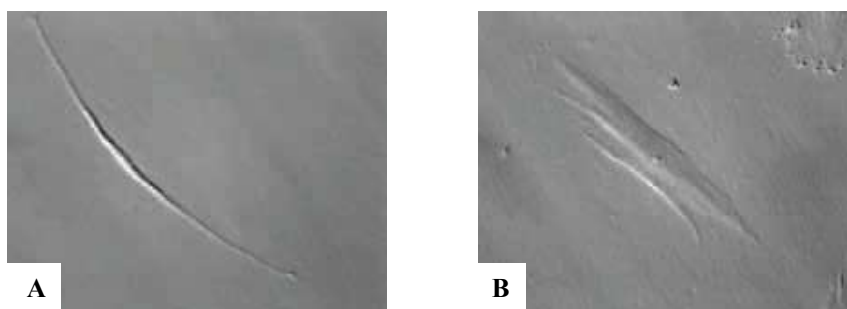
μεταβολές στο φαινότυπό τους ως απάντηση σε ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον τους εντός του τοιχώματος της αορτής, όπως το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή καθώς και η έκκριση και η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Μηχανισμοί που συμβάλλουν στη μεταβολή των φαινοτύπων των SMCs. [Owens, 2004]

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι τα SMCs να υιοθετούν έναν αποδιαφοροποιημένο φαινότυπο, τον συνθετικό. Ο συνθετικός φαινότυπος των SMCs χαρακτηρίζεται από υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα χαρακτηριστικών μορίων του συστατικού φαινοτύπου, καθώς επίσης και ικανότητα μετανάστευσης. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων υποστηρίζουν ότι ο συνθετικός φαινότυπος προκύπτει από τη διαφοροποίηση του συστατικού φαινοτύπου, με αποτέλεσμα τα SMCs να μεταναστεύουν από το μεσαίο χιτώνα της αορτής και να εντοπίζονται στην υποενδοθηλιακή στοιβάδα παθολογικού αγγείου [Hao et al, 2003]. Επιπλέον, τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό οργανιδίων που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνθεση, ενώ αντίθετα τα οργανίδια αυτά έχουν αντικατασταθεί στο μεγαλύτερο μέρος από συστατικές ίνες, στα κύτταρα του συστατικού φαινοτύπου.

Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι ο συστατικός και ο συνθετικός φαινότυπος χαρακτηρίζονται από διαφορετική μορφολογία και συγκεκριμένα τα SMCs του συστατικού φαινοτύπου είναι επιμήκη «ατρακτοειδή» κύτταρα, ενώ τα συνθετικά SMCs είναι λιγότερο επιμήκη και αναφέρονται ως «επιθηλιοειδή» ή «ρομβοειδή» (Εικόνα 3) [Chamley-Campbell et al, 1979]



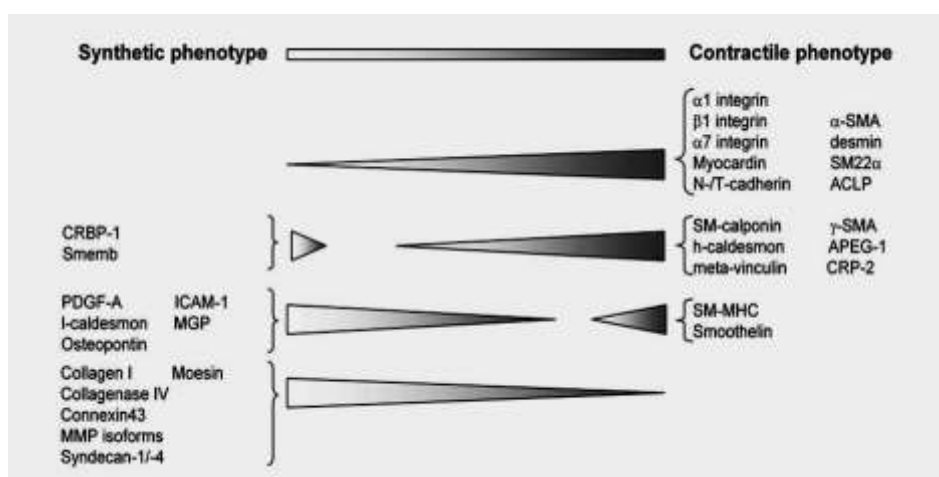
**Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των φαινοτύπων των SMCs.**

(A) Συσταλτικός φαινότυπος των SMCs (B) Συνθετικός φαινότυπος των SMCs

Η αξιοσημείωτη ικανότητα των SMCs να εναλλάσσουν τον φαινότυπό τους είναι γνωστή ως φαινοτυπική διαφοροποίηση και έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις των αγγείων, όπως είναι η αθηρωμάτωση. Οι μηχανισμοί που ενέχονται στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των SMCs, αποτελούν αντικείμενο έντονης έρευνας στον τομέα των καρδιαγγειακών παθήσεων με απώτερο σκοπό την επαναδιαφοροποίησή τους στο συσταλτικό φαινότυπο.

### A.1.3.2 Φαινοτυπικοί δείκτες των SMCs

Ο χαρακτηρισμός των SMCs, όσον αφορά στο φαινότυπό τους, πραγματοποιείται μέσω της διερεύνησης της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των SMCs. Χαρακτηριστικούς δείκτες των SMCs αποτελούν κυρίως πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η  $\alpha$ -ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), η βαριά αλυσίδα μυοσίνης (muscle-myosin heavy chain, SM-MHC), η σμουθελίνη (smoothelin-A/B), η εμβρυονική μορφή της βαριάς αλυσίδας μυοσίνης (SMemb/non-muscle MHC-B) και η κυτταρική πρωτεΐνη δέσμησης της ρετινόλης (CRBP-1). Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες λόγω της διαφοροποιημένης έκφρασης τους στους διαφορετικούς φαινοτύπους των SMCs (Εικόνα 4), έχουν συσχετιστεί με τη συστολή των SMCs, είτε ως δομικά συστατικά της «συσταλτικής συσκευής», είτε ως ρυθμιστές της συστολής.



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με έναν συγκεκριμένο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων. [Rensen et al, 2007]

Όταν τα SMCs βρεθούν σε περιβάλλον καλλιέργειας, παρατηρείται σταδιακή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης μορίων χαρακτηριστικών του συσταλτικού φαινοτύπου. Ο βαθμός υποέκφρασης των δεικτών αυτών διαφέρει, ενώ οι δείκτες οι οποίοι υπερεκφράζονται στον συνθετικό φαινότυπο συνήθως σπανίζουν. Κατά συνέπεια, η μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το συσταλτικό φαινότυπο, αποτελεί χαρακτηριστικό του συνθετικού φαινοτύπου. Επιπλέον έρευνες έχουν αναφέρει ότι τα SMCs διαφορετικών φαινοτύπων, εκφράζουν συνήθως κυμαινόμενα επίπεδα των ίδιων πρωτεϊνικών δεικτών και όχι εντελώς διαφορετικούς πρωτεϊνικούς δείκτες. Ως εκ τούτου, απαιτούνται



πληροφορίες για τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες, που σχετίζονται με έναν συγκεκριμένο φαινότυπο, για να διακρίνουμε τα SMCs του συσταλτικού και του συνθετικού φαινοτύπου, κατά προτίμηση σε συνδυασμό με στοιχεία που αφορούν την μορφολογία τους, αλλά και την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν.

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, η SM-MHC και η σμουθελίνη αποτελούν δύο καλά χαρακτηρισμένους πρωτεϊνικούς δείκτες, για τη διάκριση μεταξύ συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου. Σύμφωνα με έρευνες, η SM-MHC εκφράζεται μόνο σε SMCs, ενώ δεν έχει ανιχνευτεί σε άλλα κύτταρα in vivo καθώς αποτελεί το μόνο πρωτεϊνικό δείκτη, ο οποίος είναι ειδικός για τα SMCs κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η σμουθελίνη είναι συμπληρωματικός δείκτης της SM-MHC για τον συσταλτικό φαινότυπο, καθώς είναι πιο ευαίσθητη. Η έκφραση της σμουθελίνης παρουσιάζει ομοιομορφία και μειώνεται ταχύτερα στα αγγειακά SMCs σε καλλιέργεια, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μεταστροφή τους στο συνθετικό φαινότυπο [Christen et al, 1999]. Και οι δύο αυτοί δείκτες έχειδειχτεί ότι απουσιάζουν από τους μυοβλάστες σε μοντέλα αρτηριακής βλάβης [Christen et al, 2001].

Όσον αφορά στο συνθετικό φαινότυπο, μελέτες υποστηρίζουν ότι η SMembr/non-muscle MHC-B και η CRBP-1 σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, αποτελούν κατάλληλους δείκτες του φαινοτύπου των SMCs, δεδομένου ότι παρουσιάζουν υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα σε πολλαπλασιαζόμενα SMCs [Kuro-o et al, 1991, Neuville et al, 1997]. Επιπλέον, αλλαγές στις αναλογίες των ειδικών μοτίβων ματίσματος των πρωτεϊνών του συσταλτικού φαινοτύπου, όπως η καλδεσμόνη (h-caldesmon) και η μεταβινκουλίνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τον συνθετικό φαινότυπο [Glukhova et al, 1988].

#### **A.1.3.3 Ποικιλομορφία στην μορφολογία των SMCs**

Ιστολογικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα SMCs στο αορτικό τοίχωμα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, όπως υποδεικνύεται από την έκφραση πρωτεϊνών χαρακτηριστικών του συσταλτικού φαινοτύπου [Christen et al, 1999]. Οι διαφορές αυτές γίνονται πολύ πιο εμφανείς μετά από αγγειακό τραυματισμό.

Παρόλο που τα συνολικά επίπεδα έκφρασης των δεικτών του συσταλτικού φαινοτύπου, μετά από αγγειακό τραυματισμό αρχικά μειώνονται, η απόκριση είναι εξαιρετικά ετερογενής μεταξύ των διαφορετικών SMCs του αγγειακού τοιχώματος. Επιπλέον, σε μεταγενέστερα χρονικά διαστήματα οι δείκτες του συσταλτικού φαινοτύπου

αρχίζουν πάλι να εκφράζονται σταδιακά από διάφορους πληθυσμούς και όχι ομοιόμορφα [Regan et al, 2000].

Περισσότερες πληροφορίες για την φύση της ποικιλομορφίας των SMCs, έχουν προκύψει από μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες [Bochaton-Piallat et al, 1996, Hao et al, 2002]. Σύμφωνα με έρευνες, η δημιουργία πρωτογενών καλλιέργειών των SMCs μετά από ενζυμική επεξεργασία, έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποιημένη έκφραση πρωτεϊνών του συσταλτικού φαινοτύπου, ενώ επίσης έχει αναφερθεί ότι ένα ποσοστό των κυττάρων δεν εκφράζει καθόλου τους ειδικούς δείκτες του συσταλτικού φαινοτύπου.

Η ποικιλομορφία των SMCs στο αορτικό τοίχωμα, δεν αντικατοπτρίζεται μόνο από τους δείκτες του συσταλτικού φαινοτύπου, αλλά και από διάφορες πρωτεΐνες του μεσοκυττάριου χώρου καθώς και μόρια προσκόλλησης, τα οποία παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση συγκριτικά με τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου. Έρευνες έχουν δείξει, διαφορετική γονιδιακή έκφραση των υπομονάδων ιντεγκρίνης σε διάφορους υποπληθυσμούς των SMCs [Moiseeva et al, 2001], καθώς και διαφορετική έκφραση της N-κατχερίνης και T-κατχερίνης στα αορτικά στρώματα των SMCs, με πιο αυξημένα επίπεδα στα SMCs που είναι γειτονικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, τα SMCs των αρτηριών που προέρχονται από τη γενετική ακρολοφία εκφράζουν κοννεξίνη 43, σε αντίθεση με τα SMCs των μυϊκών αρτηριών. Διαφορές έχουν βρεθεί και στην έκφραση της κοννεξίνης 43 και της δεσμίνης, ανάμεσα στα ελαστικά και μυϊκά τμήματα, σε κύτταρα μαστικής αρτηρίας [Ko et al, 1999].

Οι διαφορές μεταξύ των SMCs, τόσο όσον αφορά στην γονιδιακή έκφραση ποικίλων δεικτών, όσο και στα λειτουργικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, ακόμη και μέσα στο ίδιο αγγείο, υποδεικνύουν τη συμβολή της γενετικής συνιστώσας στην ποικιλομορφία των SMCs. Επιπλέον, τα SMCs έχουν παρόμοια εμβρυολογική προέλευση και «μοιράζονται» παρόμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η ιδέα, επιβεβαιώνεται από πολλαπλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων, όπου παρατηρήθηκε διατήρηση του αρχικού τους φαινοτύπου παρά τις αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα, εντός της πνευμονικής αρτηρίας βοοειδών, έχουν περιγραφεί τέσσερις φαινότυποι με διαφορετική έκφραση πρωτεϊνικών δεικτών και διαφορετική μορφολογία. Η ετερογένεια που παρατηρείται σε SMCs του ίδιου αγγείου έχει επιβεβαιωθεί και με μελέτες που διεξήχθησαν σε πειραματικά μοντέλα αρουραίου [Bochaton-Piallat et al, 1996] και χοίρου [Hao et al, 2002], καθώς και με ιστολογικές μελέτες του αορτικού τοιχώματος στον άνθρωπο [Li et al, 2001].

Οι φαινοτυπικές διαφορές των SMCs που παρατηρήθηκαν σε μοντέλα ζωντανών οργανισμών επιβεβαιώθηκαν και σε *in vitro* μελέτες. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν τα SMCs που απομονώθηκαν από θωρακική αορτή ανθρώπου, τα οποία μετά από ενζυματική επεξεργασία παρουσίαζαν επιθηλιοειδή και ατρακτοειδή μορφολογία. Και οι δύο κυτταρικοί τύποι είχαν παρόμοια έκφραση γονιδίων του συσταλτικού φαινοτύπου, αλλά μόνο στα ατρακτοειδή κύτταρα παρατηρήθηκε έκφραση της μεταβικουλίνης, καθώς και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της SM-MHC και της καλπονίνης.

Επιπλέον, διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών κλώνων παρατηρήθηκαν στο ρυθμό πολλαπλασιασμού, στη συσσώρευση μορίων εξωκυττάριας μάζας και στην απόκριση σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες. Ένα τυπικό ατρακτοειδές κύτταρο είχε την ικανότητα να υιοθετεί είτε τον συνθετικό, είτε τον συσταλτικό φαινότυπο, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του ορού [Li et al, 1999]. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι παρόλο ότι οι φαινότυποι των SMCs παραμένουν σταθεροί σε καλλιέργεια, μπορούν να τροποποιηθούν έτσι ώστε τα SMCs να υιοθετήσουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, επιτρέποντας έτσι τη μελέτη των παραγόντων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του φαινοτύπου.

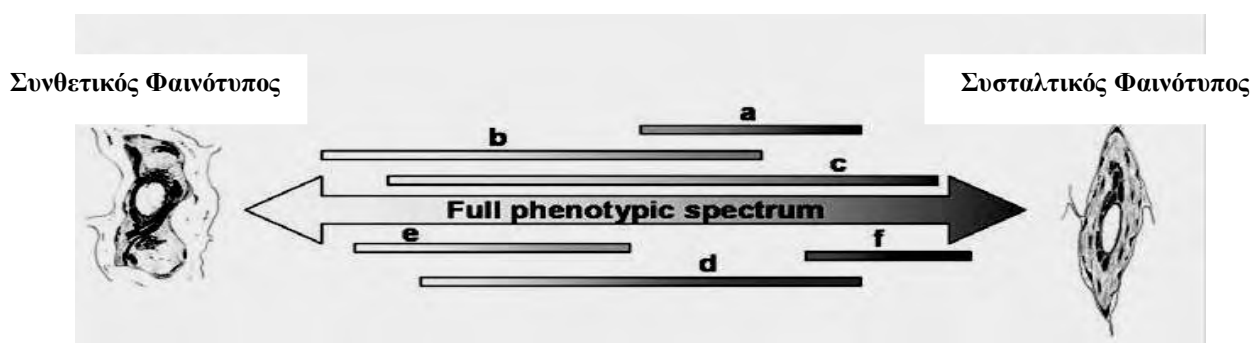
Κλώνοι SMCs που έχουν την ικανότητα να αντιστρέψουν την φαινοτυπική τους ρύθμιση και προς τα δύο άκρα του φαινοτυπικού φάσματος, έχουν επίσης απομονωθεί από στεφανιαίες αρτηρίες χοίρων [Hao et al, 2002]. Τα παραπάνω κύτταρα εμφάνισαν φαινοτυπική διαφοροποίηση, μετά από επώαση με τον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (FGF-2) ή τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (PDGF-B). Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας κατεύθυνε τα ατρακτοειδή κύτταρα να διαφοροποιηθούν προς τον συνθετικό φαινότυπο, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης και μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της σμουθελίνης και της SM-MHC.

Συμπερασματικά, οι παραπάνω έρευνες αποδεικνύουν ότι ενώ ο φαινότυπος των SMCs είναι γενετικά προκαθορισμένος, τοπικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα μπορούν να τροποποιούν τα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων. Το γεγονός αυτό δημιουργεί ερωτηματικά για τη σημασία των τοπικών περιβαλλοντικών συνθηκών σε σύγκριση με τον γενετικό προγραμματισμό.

Μία επιπλέον μελέτη, στην οποία καλλιεργήθηκαν αρτηριακά SMCs διαφορετικών φαινοτύπων και μεταφέρθηκαν σε καρωτιδικές αρτηρίες αρουραίων, αποδεικνύει ότι ο γενετικός προγραμματισμός είναι τουλάχιστον τόσο σημαντικός όσο και το περιβάλλον [Bochaton-Piallat et al, 2001]. Τα παραπάνω κύτταρα, είτε ήταν ατρακτοειδή που είχαν απομονωθεί από νεογέννητους αρουραίους είτε επιθηλιοειδή κύτταρα από γηρασμένους

αρουραίους, διατήρησαν τα ειδικά πρότυπα έκφρασης της SM-MHC και της SMembr/non-muscle MHC-B in vivo. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα επιθηλιοειδή SMCs διατήρησαν την έκφραση της CRBP-1, τουλάχιστον για είκοσι μέρες. Με αυτά τα πειράματα αποδείχτηκε και in vivo ότι η ποικιλομορφία είναι μία ενδογενής ιδιότητα των SMCs.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις ποικίλουν μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των SMCs και μπορούν να καθορίσουν τα άκρα του φαινοτυπικού φάσματος που μπορεί να υιοθετήσει κάθε μεμονωμένο λείο μυϊκό κύτταρο. Η διαμόρφωση του φαινοτύπου είναι εφικτή μόνο μεταξύ αυτών των ορίων και επηρεάζεται από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (Εικόνα 5). Η πρόκληση για μελλοντικές έρευνες είναι η μελέτη του βαθμού, με τον οποίο οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε γενετικό επαναπρογραμματισμό, με αποτέλεσμα να μετατοπίζονται τα όρια του φαινοτυπικού φάσματος.



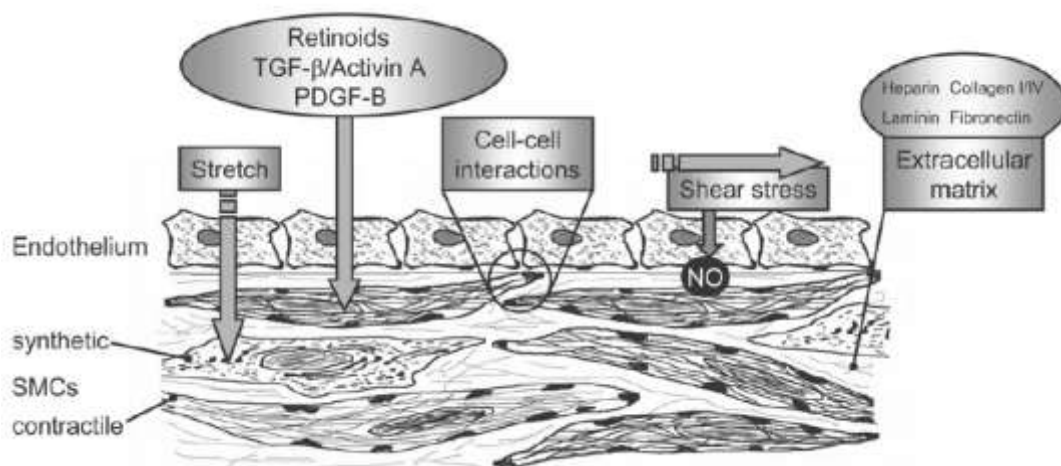
**Εικόνα 5: Φαινοτυπικό φάσμα των αρτηριακών λείων μυϊκών κυττάρων**

Τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν συλλογικά να καλύψουν όλο το φαινοτυπικό φάσμα (a-f). Κάθε δεδομένος κυτταρικός πληθυσμός λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί να καλύψει μία μόνο περιορισμένη περιοχή του φάσματος. Τα όρια του φάσματος για κάθε δεδομένο πληθυσμό λείων μυϊκών κυττάρων είναι καθορισμένα από επιγενετικά προγράμματα αλλά μπορούν να μεταβληθούν εντός των ορίων με μια διαδικασία που ελέγχεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. [Rensen et al, 2007]

#### A.1.3.4 Ρύθμιση του φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων

Μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια σχετικά με τον προσδιορισμό των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και τον φαινότυπο των SMCs. Πρόσφατα επανεξετάστηκε ο σημαντικός ρόλος του παράγοντα απόκρισης ορού (SRF) και του συνενεργοποιητή του, της μυοκαρδίνης [Owens et al, 2004, Miano et al, 2003]. Σύμφωνα με αυτές τις έρευνες, οι διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις και οι εναλλακτικά ματισμένες ισομορφές του SRF έχουν συγκεκριμένες επιπτώσεις στη μεταγραφή των γονιδίων των SMCs και κατά συνέπεια μπορούν να συμβάλουν στην ποικιλομορφία τους. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η μυοκαρδίνη έχει ετερογενές πρότυπο έκφρασης στα SMCs διαφορετικών ιστών, το οποίο μπορεί να συμβάλει σε αλλαγές στην έκφραση γονιδιακών δεικτών, και κατά συνέπεια στη λειτουργία των SMCs [Wang et al, 2001].

Παρόλο που όλο και περισσότεροι παράγοντες μεταγραφής που ρυθμίζουν τον φαινότυπο των SMCs έχουν καθοριστεί, η λίστα με τους παράγοντες που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν συνεχίζει να διευρύνεται. Οι παραπάνω παράγοντες συνιστούν τα τοπικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα που σε συνεργασία με τη γενετική προδιάθεση, καθορίζουν τον φαινότυπο ενός δεδομένου λείου μυϊκού κυττάρου. Οι παράγοντες ποικίλουν ως προς τη φύση τους και περιλαμβάνουν μία ποικιλία διαλυτών βιολογικών ουσιών, πρωτεϊνών εξωκυττάριας μάζας καθώς και φυσικές παραμέτρους (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη φαινοτυπική ρύθμιση των λείων μυϊκών κυττάρων. [Rensen et al,2007]

#### A.1.3.5 Ο ρόλος των βιοχημικών παραγόντων στη ρύθμιση του φαινοτύπου

Έχει αναφερθεί ότι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση των φαινοτυπικών δεικτών των SMCs, μερικοί από τους οποίους επιδρούν ανάλογα με το φαινότυπο. Δύο μόρια του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), ο PDGF-A και ο PDGF-B, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγγειακής ανάπτυξης και χαρακτηρίζονται από επαγωγή μεσεγχυματικών κυττάρων και επακόλουθο πολλαπλασιασμό [Hellstrom et al, 1999, Schattemann et al, 1996].

Στα ενήλικα SMCs, ισομορφές του PDGF επάγουν ένα συνθετικό φαινότυπο. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε SMCs αορτής αρουραίου, βρέθηκε ότι ο PDGF-B μειώνει την έκφραση της  $\alpha$ -ακτίνης των SMCs [Li et al, 1997]. Ομοίως, όταν SMCs από στεφανιαίες αρτηρίες χοίρου καλλιεργήθηκαν παρουσία του PDGF-B, είχαν σαν αποτέλεσμα την υιοθέτηση μιας ρομβοειδούς μορφολογίας και αυξημένα επίπεδα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης [Hao et al, 2002]. Τα παραπάνω *in vitro* αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και από *in vivo* μελέτες που δείχνουν ότι με αναστολή είτε του PDGF-A είτε του PDGF-B, μειώνεται ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης μετά από αρτηριακό τραυματισμό σε ενήλικες, αποτρέποντας την δημιουργία της υποενδοθηλιακής στοιβάδας [Kotani et al, 2003].

Επιπλέον μελέτες υποστηρίζουν ότι ισομορφές του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα (TGF- $\beta$ ) φαίνεται να ενέχονται στην επαγωγή του συσταλτικού φαινοτύπου των SMCs. Μετά από έρευνες σε *knock out* ποντίκια βρέθηκε ότι ο TGF- $\beta$ , όπως και οι ισομορφές του PDGF, έχουν καθοριστικό ρόλο στην μετανάστευση των πρόδρομων SMCs προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις επακόλουθες αλληλεπιδράσεις τους [Sanford et al, 1997]. Επιπλέον, κύτταρα της νευρικής ακρολοφιάς διαφοροποιήθηκαν σε ατρακτοειδή μετά από επίδραση με τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  [Shah et al, 1996]. Έρευνες έδειξαν ότι η σηματοδότηση του TGF- $\beta$ 1 ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, ειδικών των SMCs, στα εμβρυϊκά σωματίδια (embryoid bodies) [Sinha et al, 2004].

Σε αντίθεση με τον PDGF, οι ισομορφές του TGF- $\beta$  προωθούν το συσταλτικό φαινότυπο στα ενήλικα SMCs. Συγκεκριμένα, ο TGF- $\beta$ 1 αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -SM, της SM-MHC και της SM-καλπονίνης [Hautmann et al, 1997], ενώ ο TGF- $\beta$ 2 αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -SM και της δεσμίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες SMCs [Hao et al, 2002]. Επίσης έχει αναφερθεί ότι ο TGF- $\beta$  επάγει την έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, όπως η p21, οι οποίες καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση και την

αποικοδόμηση των πρωτεϊνών εξωκυττάριας μάζας [Moustakas et al, 2002, Hocesvar et al, 2000]. Ωστόσο, ο TGF- $\beta$ 2 δεν επηρεάζει την έκφραση των πιο προηγμένων δεικτών του συσταλτικού φαινοτύπου, όπως τη SM-MHC και τη σμουθελίνη. Τέλος, η ακτιβίνη A επίσης διεγείρει την έκφραση των πρωτεϊνικών δεικτών του συσταλτικού φαινοτύπου όπως η  $\alpha$ -SM και η SM22 $\alpha$  [Engelse et al, 2002].

Το ρετινοϊκό οξύ, όπως και ο PDGF και ο TGF- $\beta$ , είναι απαραίτητο για την πρόωμη διαφοροποίηση των SMCs, ιδιαίτερα για εκείνα που προέρχονται από την νευρική ακρολοφία [Colbert et al, 1996]. Μελέτη απέδειξε ότι η επώαση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων με ρετινοϊκό οξύ, επάγει τη διαφοροποίησή τους προς SMCs [Drab et al, 1997]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία επίδραση ρετινοϊκού οξέος σε ενήλικα SMCs μπορεί να οδηγήσει είτε στον συσταλτικό είτε στον συνθετικό φαινότυπο, ενώ φαίνεται ότι ο συσταλτικός φαινότυπος να είναι ο κυρίαρχος [Miano et al, 1998]. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση δεικτών του συσταλτικού φαινοτύπου, συμπεριλαμβανομένου της σμουθελίνης και της SM-MHC, είναι αυξημένη μετά από επώαση με ρετινοϊκό οξύ ενώ επίσης υποστηρίζουν ότι τα ρετινοειδή μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των SMCs [Chen et al, 1998]. Επιπλέον, το ρετινοϊκό οξύ μειώνει τη μετανάστευση των SMCs, μέσω επαγωγής ειδικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μάζας [Johst et al, 2003]. Ωστόσο, ο CRBP-1, ένας από τους καλύτερους δείκτες του συνθετικού φαινοτύπου, παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης μετά από επαγωγή με ρετινοϊκό οξύ και έχει αναφερθεί ότι τα ρετινοειδή προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [Neuville et al, 1997]. Οι διαφορικές επιδράσεις του ρετινοϊκού οξέος στο φαινότυπο των SMCs φαίνεται να σχετίζεται με το αρχικό φαινότυπο των κυττάρων που εξετάστηκαν.

Επίσης, αρκετές άλλες πρωτεΐνες έχουν αναφερθεί ότι έχουν διαφορικές επιδράσεις στον φαινότυπο των SMCs, ανάλογα με τον αρχικό φαινότυπό τους. Αυτή η ιδέα οδήγησε σε αντιφατικά συμπεράσματα, όσον αφορά για παράδειγμα στην επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- $\alpha$ ) στον πολλαπλασιασμό των SMCs. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο TNF- $\alpha$  έχει διαφορετικές επιπτώσεις στα ατρακτοειδή από ότι στα επιθηλιοειδή SMCs που απομονώθηκαν από ανθρώπινη αρτηρία [Wang et al, 2005]. Συγκεκριμένα, τα ατρακτοειδή κύτταρα είχαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού μετά από επώαση με TNF- $\alpha$ , ενώ στα επιθηλιοειδή ο TNF- $\alpha$  επάγει την αποπτωτική διαδικασία. Ομοίως, η αγγειοτενσίνη II φαίνεται να επάγει την απόπτωση στα επιθηλιοειδή και όχι στα ατρακτοειδή κύτταρα που απομονώθηκαν από αορτή αρουραίου [Bascands et al, 2001].

Επιπλέον, ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας (IGF-I) φαίνεται να έχει διαφορετικά αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των SMCs, ανάλογα με τον φαινότυπο [Hayashi et al, 2004]. Τα ατρακτοειδή SMCs απαιτούν τη σηματοδότηση του IGF-I για να διατηρήσουν τον συσταλτικό φαινότυπο, ενώ τα επιθηλιοειδή SMCs αυξάνουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης μετά από επώαση με IGF-I. Συνεπώς εκτός από το ρετινοϊκό οξύ, τον TNF-α και την αγγειοτενσίνη II και ο IGF-I επίσης συνεισφέρει στην ποικιλομορφία των SMCs.

#### **A.1.3.6 Ο ρόλος της εξωκυττάριας μάζας στη ρύθμιση του φαινοτύπου**

Οι περισσότερες έρευνες στο παρελθόν είχαν στο επίκεντρο, το ρόλο των αυξητικών παραγόντων στη ρύθμιση του φαινοτύπου των SMCs. Σήμερα οι έρευνες έχουν εστιάσει και στην εξωκυττάρια μάζα στην οποία ενσωματώνονται τα SMCs και φαίνεται να είναι εξίσου σημαντική. Η ρύθμιση του φαινοτύπου από τα συστατικά της εξωκυττάριας μάζας θεωρείται ότι πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης των SMCs σε ειδικούς υποδοχείς ιντεγκρινών.

Το μεγαλύτερο μέρος της έσω εξωκυττάριας μάζας αποτελείται από ισομορφές κολλαγόνου (κυρίως τύπου I και III), ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες. Ανάμεσα στα συστατικά αυτά, η πρωτεογλυκάνη ηπαρίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για τη ρύθμιση του φαινοτύπου, καθώς προάγει τη διατήρηση του συσταλτικού φαινοτύπου και επιβραδύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες έδειξαν ότι η επώαση των SMCs χοίρου με ηπαρίνη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανεξαρτήτως φαινοτύπου και αυξάνει τα επίπεδα δεσμίνης στα ατρακτοειδή κύτταρα [Hao et al, 2002]. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η ηπαρίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό μόνο των ρομβοειδών SMCs από βοοειδή, προτείνοντας ότι οι επιπτώσεις της εξαρτώνται από τα εγγενή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των SMCs [Frid et al, 1997].

Μία ακόμη πρωτεογλυκάνη, η περλεκάνη, φαίνεται να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των SMCs, μέσω των θειούχων πλευρικών αλυσίδων, οι οποίες δεσμεύουν τον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (FGF-2) [Tran et al, 2004]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία μελέτη που απέδειξε ότι η περλεκάνη ρυθμίζεται αρνητικά από τις ισομορφές του PDGF, γεγονός που επηρεάζει τη μετανάστευση των SMCs [Koyama et al, 1998].

Επιπλέον, έχουν βρεθεί και άλλα συστατικά της εξωκυττάριας μάζας που αποτελούν παραδείγματα για την σύνθετη σχέση μεταξύ της σύστασης της εξωκυττάριας μάζας και του φαινοτύπου των SMCs. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το ινώδες κολλαγόνο τύπου I οδηγεί σε έναν συσταλτικό φαινότυπο, ενώ το μονομερές κολλαγόνο τύπου I ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των SMCs. Εάν συγκριθούν τα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε μονομερές



κολλαγόνο με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πολυμερές κολλαγόνο, παρατηρείται ένα εντελώς διαφορετικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης και πολλά από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μάζας ή του κυτταροσκελετού [Ichii et al, 2001]. Τέλος, η σύσταση των ινών κολλαγόνου επηρεάζει την μεταναστευτική ικανότητα των SMCs, η οποία σχετίζεται με διαφορετική τοπική διαμόρφωση προσκόλλησης και λειτουργία των ιντεγκρινών [Li et al, 2000]

Επιπλέον έρευνες έδειξαν ότι, εκτός από το ινώδες κολλαγόνο τύπου I, το κολλαγόνο τύπου IV και η λαμινίνη επάγουν το συσταλτικό φαινότυπο [Thyberg et al, 1994]. Όμως έχει αναφερθεί ότι η λαμινίνη-5 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των SMCs που διεγείρεται από τον PDGF-B, γεγονός που αποδεικνύει την άποψη ότι μερικές πρωτεΐνες έχουν ασαφή επίδραση στον φαινότυπο των SMCs. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση της παραπάνω πρωτεΐνης ρυθμίζεται θετικά από τον TGF- $\beta$  και τον PDGF-B, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την ποικιλομορφία στον φαινότυπο [Kingsley et al, 2002].

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μάζας φαίνεται να είναι απαραίτητες για την επαγωγή και τη διατήρηση του συσταλτικού φαινοτύπου, η φιμπρονεκτίνη μία άλλη βασική πρωτεΐνη της εξωκυττάριας μάζας, οδηγεί στον συνθετικό φαινότυπο [Hedin et al, 1988]. Επίσης το υαλουρονικό οξύ, μία γλυκοζαμινογλυκάνη που εντοπίζεται στο μέσο της εξωκυττάριας μάζας, φαίνεται να προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των SMCs [Evanko et al, 1999]. Επιπλέον έρευνες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του υαλουρονικού οξέος σε SMCs ποντικών, επιταχύνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, η οποία σχετίζεται με φαινοτυπική ρύθμιση των κυττάρων προς τον συνθετικό φαινότυπο.

Πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες τριών διαστάσεων (3D culture systems), υποδεικνύουν ότι ο φαινότυπος των λείων μυϊκών κυττάρων επηρεάζεται όχι μόνο από τη σύσταση της εξωκυττάριας μάζας, αλλά και από την οργάνωσή της. Τα SMCs σε μία καλλιέργεια τριών διαστάσεων παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TGF- $\beta$ 1 σε σύγκριση με τα SMCs σε καλλιέργεια δύο διαστάσεων [Li et al, 2003]. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -SM παρουσίασαν μικρή μείωση, ενώ η έκφραση του κολλαγόνου τύπου I αυξήθηκε στα συστήματα τριών διαστάσεων, υποδεικνύοντας ένα λιγότερο συσταλτικό φαινότυπο και απεικονίζοντας την πολυπλοκότητα των επιπτώσεων της εξωκυττάριας μάζας, στον φαινότυπο των SMCs. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι οι κυτταρικές αποκρίσεις των SMCs στον PDGF-B, στον TGF- $\beta$ 1 και στην ηπαρίνη, επηρεάζονται από την οργάνωση της εξωκυττάριας μάζας [Stegemann et al, 2003].

Από τις παραπάνω μελέτες αποδεικνύεται ότι η σύσταση και η οργάνωση της εξωκυττάριας μάζας κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του φαινοτύπου των SMCs. Η συμβολή της εξωκυττάριας μάζας στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των SMCs καθιστά απαραίτητη τη διεξαγωγή περισσότερων ερευνών προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι ακριβείς συνέπειες της εξωκυττάριας μάζας στα SMCs in vivo, καθώς αποτελείται από πληθώρα συστατικών και οι φαινοτυπικές αλλαγές πραγματοποιούνται μέσω διαφόρων συνδυασμών ιντεγκρινών. Επιπλέον, θα πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι η εξωκυττάρια μάζα είναι μία «δεξαμενή» κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που είναι συνδεδεμένα με συγκεκριμένα συστατικά της. Αυτό έχει ως συνέπεια, μεταβολές στην σύσταση ή στον όγκο της εξωκυττάριας μάζας, να επηρεάζουν άμεσα τη βιοδιαθεσιμότητα των παραπάνω παραγόντων και να προσθέτουν μία άλλη διάσταση στην αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοχημικών ουσιών και των συστατικών της εξωκυττάριας μάζας, κατά τη ρύθμιση του φαινοτύπου των SMCs.

#### **A.1.3.7 Ο ρόλος των φυσικών παραγόντων στη ρύθμιση του φαινοτύπου**

Τα αγγειακά SMCs δέχονται συνεχώς μηχανικά ερεθίσματα που έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον φαινότυπό τους, όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου. Η πίεση προκαλεί τάση επιμήκυνσης, ενώ η αιματική ροή προκαλεί τάση διάτμησης έχοντας ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση του αορτικού τοιχώματος μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά των SMCs. Οι συνέπειες της τάσης διάτμησης διαμεσολαβούνται από το ενδοθήλιο, το οποίο συντονίζει την απόκριση των SMCs σε αυτόν τον τύπο μηχανικής καταπόνησης. Αυτό συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης μονοξειδίου του αζώτου (NO) αλλά και πιθανόν και μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου.

Μελέτες υποστηρίζουν ότι εάν καλλιεργηθούν μαζί ενήλικα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενήλικα ατρακτοειδή SMCs χοίρου, τα τελευταία θα διαμορφωθούν προς ένα συνθετικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα, τα ατρακτοειδή κύτταρα αποκτούν μία ρομβοειδή μορφολογία, μειώνεται η έκφραση της  $\alpha$ -SM και SM-MHC και χάνουν την έκφραση σμουθελίνης [Hao et al, 2002]. Ωστόσο είναι προφανές ότι οι φυσιολογικές φυσικές και βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ SMCs κυττάρων δεν μπορούν να προσομοιωθούν πλήρως, με αυτές σε επίπεδο καλλιέργειας.

Σε αντίθεση με την τάση διάτμησης, η επιμήκυνση δρα απευθείας στα SMCs. Η μηχανική καταπόνηση φαίνεται να ενισχύει την έκφραση μορίων της εξωκυττάριας μάζας

και των πρωτεϊνών του συσταλτικού φαινοτύπου των SMCs, στο αρτηριακό τοίχωμα. Μετά από εφαρμογή φυσιολογικής μηχανικής καταπόνησης σε ενήλικα αορτικά SMCs, αυξήθηκε η σύνθεση κολλαγόνου και φιμπρονεκτίνης, καθώς και τα επίπεδα ενζύμων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μάζας [O'Callaghan et al, 2000]. Η παραπάνω μελέτη αποδεικνύει ότι η μηχανική καταπόνηση είναι ένας αιτιώδης παράγοντας για την ενεργή αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος μέσω των SMCs.

Είναι πλέον γνωστό ότι οι ιντεγκρίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή της μηχανικής καταπόνησης, ενώ σε συνδυασμό με φυσικούς παράγοντες επηρεάζουν τον φαινότυπο των SMCs. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι οι αλληλεπιδράσεις της εξωκυττάριας μάζας και των ιντεγκρινών οδηγούν στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία ενέχονται στον φαινότυπο των SMCs, καθώς επίσης υποδεικνύουν ότι αλλαγές στη σύσταση της εξωκυττάριας μάζας είναι εξαιρετικά σημαντικές για την απόκριση των SMCs σε μηχανικά ερεθίσματα.

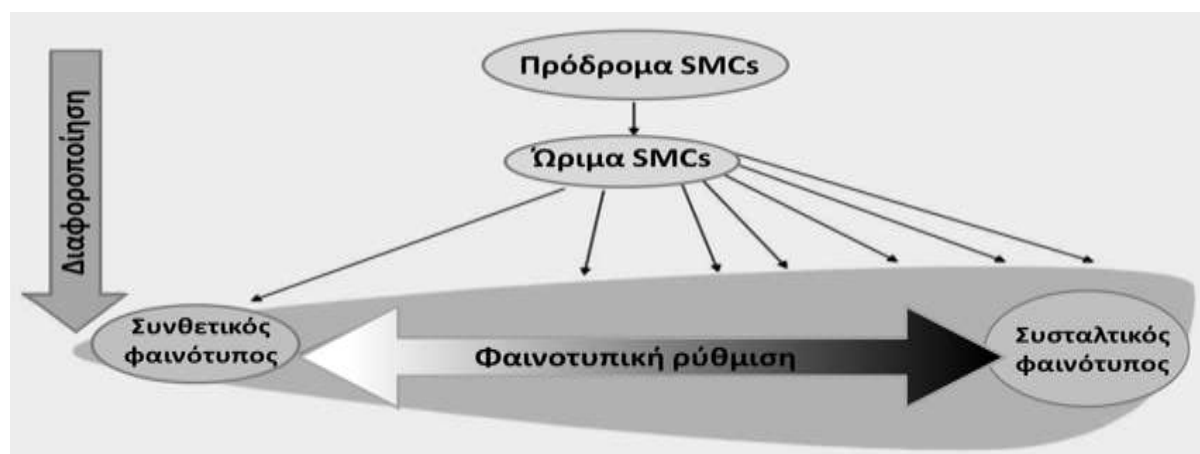
Πράγματι, η εφαρμογή μηχανικού ερεθίσματος σε SMCs αρουραίου είχε ποικίλα αποτελέσματα ανάλογα με το είδος του υποστρώματος της εξωκυττάριας μάζας στο οποίο καλλιεργήθηκαν [Reusch et al, 1997], χωρίς όμως να εξαρτάται από τον τύπο της εξωκυττάριας μάζας. Σε μία άλλη μελέτη, εφαρμόστηκε μηχανική καταπόνηση σε SMCs που καλλιεργήθηκαν σε λαμινίνη και παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της h-caldesmon συγκριτικά με SMCs που καλλιεργήθηκαν σε κολλαγόνο τύπου I ή IV [Birukov et al, 1998]. Έχει επίσηςδειχθεί ότι τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από την επιμήκυνση και την τάση διάτμησης, αυξάνουν την έκφραση της SM-MHC [Reusch et al, 1996].

Σε ομοιότητα με τις διάφορες αλλαγές που έχουν αναφερθεί στην έκφραση των γονιδιακών δεικτών των SMCs, αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα που υπάρχουν σχετικά με την απόκριση σε μηχανική καταπόνηση των SMCs σε καλλιέργεια. Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έχει αναφερθεί μειωμένος αλλά και αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού [Hipper et al, 2000, Birukov et al, 1995], που μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στο βαθμό και στο είδος της επιμήκυνσης που εφαρμόστηκε και στον αρχικό φαινότυπο των κυττάρων. Τέλος, τα παραπάνω αντιφατικά αποτελέσματα μπορεί στην πραγματικότητα να αντικατοπτρίζουν τόσο την ενδογενή ποικιλομορφία των SMCs, όσο και την ποικιλομορφία που οφείλεται σε ένα διαφορετικό τοπικό περιβάλλον.

Συμπερασματικά, είναι κατανοητό ότι η μηχανική καταπόνηση έχει σημαντική επίπτωση στον φαινότυπο των SMCs. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, το φυσιολογικό στρες προωθεί τον συσταλτικό φαινότυπο των SMCs, ενώ περισσότερη ή λιγότερη

καταπόνηση οδηγεί σε έναν συνθετικό φαινότυπο. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω έρευνες *in vitro* για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, οι οποίες παρεμποδίζονται σε μεγάλο βαθμό από την έλλειψη ενός συστήματος που ομοιάζει με την καταπόνηση που παρατηρείται *in vivo*.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι ένα βασικό πρόγραμμα διαφοροποίησης είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη ενός πρόδρομου λείου μυϊκού κυττάρου, το οποίο χαρακτηρίζεται από την έκφραση της  $\alpha$ -SM, της βασικής πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού των SMCs (Εικόνα 7). Περαιτέρω διαφοροποίηση, η οποία είναι επίσης (επι)γενετικά προγραμματισμένη, μπορεί να επιφέρει είτε το συσταλτικό είτε το συνθετικό φαινότυπο, καθώς επίσης και ενδιάμεσους φαινοτύπους. Οι αρχικοί φαινότυποι υπόκεινται σε επιδράσεις (δυνάμεις ή παράγοντες) του τοπικού περιβάλλοντος, οι οποίες στη συνέχεια καθορίζουν τη περαιτέρω διαφοροποίηση, εντός του αρχικού εύρους που καθορίζεται από το αρχικό γενετικό πρόγραμμα [Rensen et al, 2007]



**Εικόνα 7: Μονοπάτια διαφοροποίησης των SMCs**

Τα πρόδρομα SMCs αρχικά διαφοροποιούνται προς ένα πρώιμο συνθετικό φαινότυπο. Η πλειοψηφία των SMCs μεταγενέστερα, αποκτά έναν πιο συσταλτικό φαινότυπο, αν και ο βαθμός διαφοροποίησης ποικίλει και αρκετά κύτταρα διατηρούν έναν φαινότυπο μεταξύ του συνθετικού και του συσταλτικού. Τόσο τα διαφοροποιημένα κύτταρα του συνθετικού φαινοτύπου, όσο και του συσταλτικού μπορούν αντιστρέψιμα να μεταβάλλουν τον φαινότυπό τους μέσω φαινοτυπικής ρύθμισης. [Rensen et al, 2007]

Η ικανότητα των SMCs να μεταβάλλουν το φαινότυπό τους έχει ως αποτέλεσμα κάθε αγγείο να έχει μία διαφορετική σύσταση SMCs, που είναι σε θέση να πραγματοποιεί διαφορετικές συμπληρωματικές λειτουργίες και κατ'έκταση κάθε αγγείο μπορεί να προσαρμοστεί στις χρόνιες αλλαγές των τοπικών συνθηκών. Με αυτό τον τρόπο, η ποικιλομορφία των SMCs δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στην αποδοτικότητα των αγγείων αλλά μάλλον προσφέρει την απαραίτητη ευελιξία για να ανταπεξέλθει σε διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

#### **A.1.4 Αθηρωμάτωση**

Η αθηρωμάτωση είναι μία πολυπαραγοντική προοδευτική νόσος, κυρίως των μεγάλων αρτηριών, που χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση λιπιδίων και ινών συστατικών στο αρτηριακό τοίχωμα. Η συσσώρευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας στα εσωτερικά τοιχώματα του αρτηριακού τοιχώματος και κατ'επέκταση την σταδιακή νέκρωση του εσωτερικού χιτώνα, την απώλεια της ελαστικότητας των αγγείων και την μείωση του εύρους του αγγειακού αυλού [Soumian et al, 2005]. Η αθηρωμάτωση αποτελεί την κύρια αιτία της καρδιακής νόσου και του εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ σε δυτικού τύπου κοινωνίες ευθύνεται για το 50% των θανάτων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει αρκετούς περιβαλλοντικούς αλλά και γενετικούς παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με την νόσο. Ωστόσο ο ακριβής προσδιορισμός των κυτταρικών και μοριακών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στη νόσο παρεμποδίζεται λόγω της πολυπλοκότητας της ασθένειας.

Την τελευταία δεκαετία, η διαθεσιμότητα των νέων τεχνολογιών και εργαλείων, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης γενετικά τροποποιημένων ποντικών, έχει οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο τα επίπεδα της χοληστερόλης και άλλων παραγόντων κινδύνου, συμβάλλουν στην δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Είναι πλέον σαφές ότι η αθηρωμάτωση δεν είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης, αλλά μία χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να μετατραπεί σε οξύ κλινικό συμβάν εάν συμβεί ρήξη της αθηρωματικής πλάκας [Lusis et al, 2000].

##### **A.1.4.1 Αθηρωμάτωση και SMCs**

Πληθώρα μελετών προτείνει ότι η φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων από το συστατικό στο συνθετικό φαινότυπο κατέχει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση καρδιαγγειακών ασθενειών, όπως η αθηρωμάτωση [Owens et al, 2004]. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης είναι βασικής σημασίας για την εύρεση στρατηγικών περιορισμού της εξέλιξης της νόσου πριν την εκδήλωση των κλινικών συνεπειών της. Έχει βρεθεί ότι πολλά είδη κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και των SMCs, συμβάλλουν στο σχηματισμό αθηρωματικών βλαβών στα αγγεία. Συγκεκριμένα, τα SMCs συμμετέχουν τόσο στην έναρξη των πρώιμων αθηρωματικών βλαβών όσο και στην εξέλιξη της νόσου [Lusis, 2000].

Παρόλο που τα SMCs είναι ο βασικός κυτταρικός τύπος στον μεσαίο χιτώνα σε φυσιολογικές συνθήκες, σε πολλά στάδια της αθηρωματικής βλάβης τα SMCs απαντώνται στην υποενδοθηλιακή στοιβάδα που δημιουργείται λόγω τραυματισμού του αγγείου. Η ακριβής προέλευση αυτών των κυττάρων παραμένει ασαφής, αλλά η επικρατούσα θεωρία προτείνει ότι ώριμα SMCs του μεσαίου χιτώνα τροποποιούνται φαινοτυπικά και έπειτα μεταναστεύουν στην υποενδοθηλιακή στοιβάδα ως απόκριση σε αθηρογόνα ερεθίσματα [Ross et al, 1995]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία ενδογενών διακριτών κλώνων SMCs στον έσω χιτώνα αρτηριών [Schwartz and Murry, 1998, Li et al, 2001], οι οποίοι πιθανόν να συμμετέχουν στις παχύνσεις του έσω χιτώνα και στην εμφάνιση της αθηρωματικής βλάβης.

Αρκετές έρευνες έχουν εστιάσει στα χαρακτηριστικά των SMCs που εντοπίζονται εντός των στοιβάδων του ίδιου αγγείου και υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των SMCs που βρίσκονται στον έσω και μεσαίο χιτώνα. Συγκεκριμένα τα SMCs που βρίσκονται στον έσω χιτώνα αποκτούν πιθανώς μοναδικές αθηρογόνες ιδιότητες που καθιστούν γόνιμο έδαφος για την έναρξη του σχηματισμού των πλακών. Ενώ τα ανθρώπινα SMCs του μεσαίου χιτώνα εκφράζουν κυρίως πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συσταλτική λειτουργία του κυττάρου, όπως η SM-MHC ή η  $\alpha$ -SM, τα SMCs του έσω χιτώνα εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών, εμφανίζουν υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού και μεγαλύτερη συνθετική ικανότητα για εξωκυττάρια ουσία, πρωτεάσες και κυτοκίνες. SMCs που απομονώθηκαν από τρωκτικά μπορούν *in vitro* να μετατραπούν από τον συσταλτικό στον συνθετικό φαινότυπο ως απάντηση σε ποικιλία αθηρογόνων ερεθισμάτων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ελεύθερες ρίζες και λιπίδια.

Επιπλέον, η φαινοτυπική αλλαγή των SMCs σχετίζεται με την ικανότητά τους να εκτελούν διάφορες λειτουργίες. Τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου μεταναστεύουν και πολλαπλασιάζονται πιο εύκολα από τα διαφοροποιημένα SMCs, παράγουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες κολλαγόνου και τέλος εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό υποδοχείς πρόσληψης λιπιδίων. Επομένως, η μετάβαση από τον συσταλτικό στον συνθετικό φαινότυπο, ενισχύει τον παθογενετικό ρόλο των SMCs στην αθηρωμάτωση.

Κατά τη διάρκεια της αθηρωματικής βλάβης, η φαινοτυπική αλλαγή των SMCs προς τον συνθετικό φαινότυπο πραγματοποιείται μετά την έκθεση σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες και φλεγμονώδεις μεσολαβητές που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε οξειδωμένη LDL. Κατά το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο και συμβάλλουν στο σχηματισμό ινώδους κάψας πάνω από την

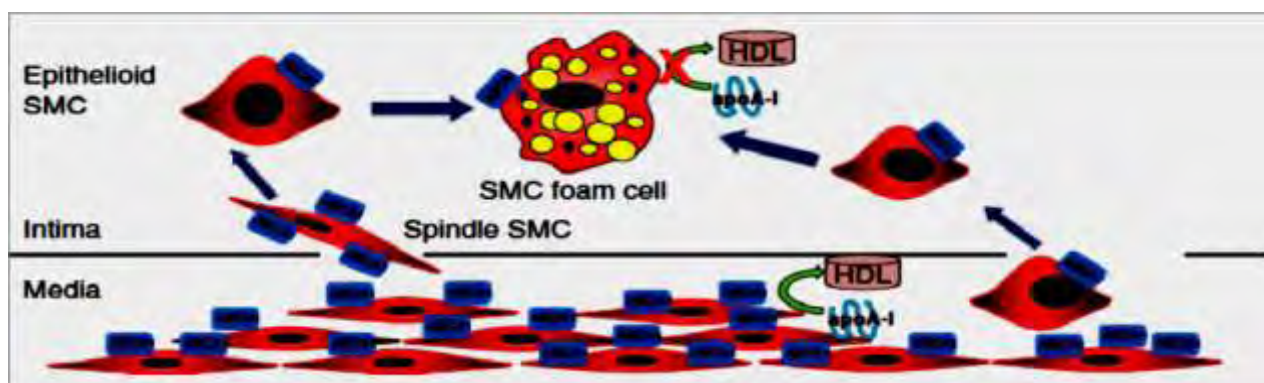
αθηρωματική πλάκα. Η ιντερφερόνη-γ (INF-γ) που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα επάγει τη σύνθεση κολλαγόνου από τα SMCs, το οποίο σταθεροποιεί την ινώδη κάψα.

Τα SMCs αλλά και τα μακροφάγα, απελευθερώνουν αποικοδομητικά ένζυμα όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι οποίες είναι ικανές να αποσταθεροποιήσουν την πλάκα με αποτέλεσμα τη ρήξη της ινώδους κάψας και την αρτηριακή θρόμβωση [Owens et al, 2004]. Επιπλέον, τα SMCs παράγουν κυτοκίνες που προσελκύουν και ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των SMCs, προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και διεγείρουν την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Μερικές από τις κυτοκίνες που είναι ικανά να παράγουν τα SMCs είναι ο PDGF, ο TGF-β, ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF), η IFN-γ, και η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (MCP-1). Παρόλο το γεγονός ότι τα SMCs παράγουν πολλές κυτταροκίνες σε αθηρογόνες συνθήκες, η ακριβής συνεισφορά τους δεν έχει αποσαφηνιστεί [Raines and Ferri, 2005].

Επιπλέον έρευνες υποστηρίζουν ότι τα SMCs του μεσαίου χιτώνα που παρουσιάζουν τον συσταλτικό φαινότυπο συσσωρεύουν μικρές ποσότητες λιπιδίων. Αντιθέτως, τα SMCs που μεταναστεύουν από τον μεσαίο στον έσω χιτώνα και αποκτούν τον συνθετικό φαινότυπο, έχειδειχθεί ότι συσσωρεύουν υπερβολικές ποσότητες χοληστερινικών εστέρων [Batetta et al, 2001, Campbell et al, 1983] και σχηματίζουν τα ονομαζόμενα «αφρώδη κύτταρα». Ο σχηματισμός των παραπάνω κυττάρων έχει επιβεβαιωθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενώ η πρόσληψη των λιπιδίων πραγματοποιείται όπως και στα μακροφάγα μέσω υποδοχέων υπεύθυνων για την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών όπως τους LDL και VLDL υποδοχείς, καθώς και μέσω υποδοχέων εκκαθαριστών (scavenger receptors) όπως ο CD36, ο LOX-1 και ο SR-A.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αφρώδων κυττάρων προερχόμενων από SMCs του συνθετικού φαινοτύπου διαδραματίζει το μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Το μονοπάτι ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης αποτελεί το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο η περίσσεια της χοληστερόλης που συσσωρεύεται εντός του κυττάρου απομακρύνεται από αυτό και μεταφέρεται στο ήπαρ. Τα κύρια μόρια που ενέχονται στο συγκεκριμένο μονοπάτι είναι δύο ισομορφές των πυρηνικών υποδοχέων LXR (Liver X Receptors), LXRα και LXRβ, οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης-μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter). Η ABCA1 προάγει την εκροή της χοληστερόλης και των φωσfolιπιδίων από τα κύτταρα στην απολιποπρωτεΐνη ApoAI (Apolipoprotein AI).

Πειραματικά δεδομένα που πραγματοποιήθηκαν σε ιστό στεφανιαίας αρτηρίας με αθηρωμάτωση [Choi et al. 2009], υποστηρίζουν ότι SMCs του συνθετικού φαινοτύπου συσσωρεύουν λιπίδια καθώς ο μηχανισμός εκροής της χοληστερόλης υπολειτουργεί. Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν μειωμένα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ABCA1 καθώς επίσης χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα μεταφοράς της περίσσειας της χοληστερόλης από την ABCA1 στην ApoAI έχοντας ως αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Μετατροπή των SMCs του συνθετικού φαινοτύπου σε αφρώδη κύτταρα. [Allahverdian and Francis, 2010]

Η αλλαγή του φαινοτύπου των SMCs από το συσταλτικό στο συνθετικό φαινότυπο έχει συσχετιστεί με τη συσσώρευση των λιπιδίων που παρατηρείται στα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην αιτιοπαθογένεια καρδιαγγειακών παθήσεων όπως είναι η αθηρωμάτωση. Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων με σκοπό την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για την καταστολή της φαινοτυπικής διαφοροποίησης των SMCs και την αποκατάσταση του φυσιολογικού τους φαινοτύπου.



### A.1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Βασικό μειονέκτημα των ερευνών σχετικά με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των SMCs είναι η απουσία SMCs του συστατικού φαινότυπου σε πρωτογενείς καλλιέργειες, δεδομένου ότι τα SMCs στις συνθήκες αυτές απαντώνται στο συνθετικό φαινότυπο.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση του φαινότυπου των SMCs σε συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν βρίσκονται σε καλλιέργεια *in vitro* παρουσιάζουν τον συνθετικό φαινότυπο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης παρουσία του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), ηπαρίνης και ορού βοός, με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου χρονικού διαστήματος κατά το οποίο τα SMCs μεταβάλουν τον φαινότυπό τους σε συστατικό. Τέλος, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση μορίων χαρακτηριστικών για τα SMCs όπως η  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM), η βιμεντίνη και η οστεοποντίνη, με σκοπό το χαρακτηρισμό του φαινότυπου τους.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1.1 Συλλογή δειγμάτων**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα (Human Aortic Smooth Muscle Cells, HASMCs) (Gibco, C-007-5C) τα οποία έχουν απομονωθεί από το μεσαίο χιτώνα φυσιολογικής αορτής.

### **B.1.2 Καλλιέργεια φυσιολογικών λείων μυϊκών κυττάρων (HASMCs)**

Η καλλιέργεια των HASMCs πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή τους. Συγκεκριμένα, για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιήθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) σε αναλογία 5% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S, Roche) σε αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4°C. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>.

Η ανακαλλιέργεια των λείων μυϊκών κυττάρων γινόταν όταν τα κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline χωρίς CaCl<sub>2</sub> και MgCl<sub>2</sub> (PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως γινόταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς συλλογή των κυττάρων.

### **B.1.3 Διαφοροποίηση HASMCs**

Τα SMCs έχουν τη δυνατότητα να αποκτούν δύο φαινοτύπους που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές ιδιότητες. Σε φυσιολογική κατάσταση τα SMCs που εντοπίζονται στο μεσαίο αορτικό χιτώνα διαθέτουν ένα «συσταλτικό» διαφοροποιημένο φαινότυπο (Contractile SMCs, Con-SMCs). Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η αορτή υποστεί κάποια βλάβη ή τα SMCs τοποθετηθούν σε καλλιέργεια υιοθετούν ένα «συνθετικό» αποδιαφοροποιημένο φαινότυπο (Synthetic SMCs, Syn-SMCs) οποίος έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Προκειμένου να αντικατοπτριστεί η *in vivo* κατάσταση στην καλλιέργεια, επιχειρήσαμε να αποκτήσουμε το συσταλτικό φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων (Con-SMCs).

Για να επιτευχθεί ο ανώτερος στόχος, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των HASMCs σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης για χρονικό διάστημα 6 έως 18 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης συνίσταται από DMEM/F-12 χωρίς την προσθήκη FBS, το οποίο εμπλουτίζεται με εμπορικά διαθέσιμο υλικό διαφοροποίησης Smooth Muscle Differentiation Medium (SMDS) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού υλικού, καθώς επίσης και 5ng/ml του αυξητικού παράγοντα TGF-β. Το SMDS αποτελείται από 1% FBS και 30μg/ml ηπαρίνη, τα οποία σε συνδυασμό με τον TGF-β επάγουν τον συσταλτικό φαινότυπο των SMCs, όταν τοποθετούνται σε καλλιέργεια.

Συγκεκριμένα, όταν τα HASMCs καλλιεργούνται σε θρεπτικό διαφοροποίησης παρατηρείται παύση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού και αλλαγή στη μορφολογία τους, ενώ επίσης εκφράζουν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα ειδικών δεικτών όπως η α-smooth muscle actin (α-SM).

HASMCs, τα οποία δεν καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα ελέγχου του συνθετικού φαινοτύπου (Syn-SMCs).

### **B.1.4 Απομόνωση πρωτεΐνης από καλλιεργημένα HASMCs.**

Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από καλλιεργημένα HASMCs και των δύο φαινοτύπων (Con-SMCs και Syn-SMCs) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων του ενδιαφέροντος σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany), προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των κυτταρικών πρωτεϊνών από τις πρωτεάσες που απελευθερώνονται από τα κυτταρικά οργάνδια κατά τη

διάλυση των κυττάρων. Έπειτα προστίθονταν κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (lysis buffer) και ακολουθούσε ομογενοποίηση των δειγμάτων.

Πιο αναλυτικά τα στάδια της απομόνωσης πρωτεΐνης είναι ως εξής:

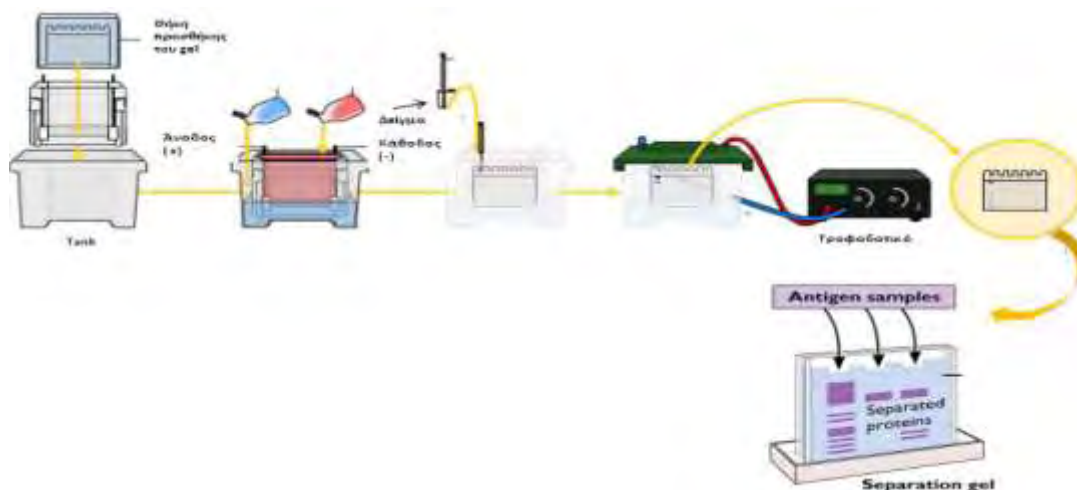
- ☐ Αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με επώαση αυτών με 1ml θρυψίνης για 10min στους 37 °C
- ☐ Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 7 λεπτά στους 4°C.
- ☐ Ξέπλυμα του ιζήματος με PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  και φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 7 λεπτά στους 4°C.
- ☐ Προσθήκη 10μl αναστολέων πρωτεασών.
- ☐ Προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης.
- ☐ Μηχανική ανάδευση σε vortex και ακόλουθη επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- ☐ Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C.
- ☐ Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο.
- ☐ Αποθήκευση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στους -80°C.

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Commassie Brilliant Blue G-25, Bio-Rad Protein Assay), όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα δείγματα, δημιουργήθηκε αρχικά μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης απορρόφησης και πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, με την χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Έπειτα για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προστέθηκαν 5μl από κάθε δείγμα σε 495μl διάλυμα Bradford, ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές, μεταφορά τους σε κυβέττα και τέλος φωτομέτρηση στα 595nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη που είχε δημιουργηθεί βάση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

### **B.1.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου – SDS**

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους. Η διάλυση των πρωτεϊνών σε διάλυμα SDS είναι αυτή που επιτρέπει το διαχωρισμό τους κυρίως βάσει της μάζας τους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μια φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες

αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, προσδίδοντας έτσι στην αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, καθιστώντας το αρχικό φορτίο αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμίδιου με κατεύθυνση ροής από επάνω προς τα κάτω (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου

#### B.1.5.1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών

Πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη αυτών. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε :

- x μl (20μg) πρωτεϊνικό δείγμα
- 5 μl Sample Buffer
- 2 μl Reducing Buffer
- y μl ddH<sub>2</sub>O (μέχρι τελικό όγκο 24μl)

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95°C για 5min.

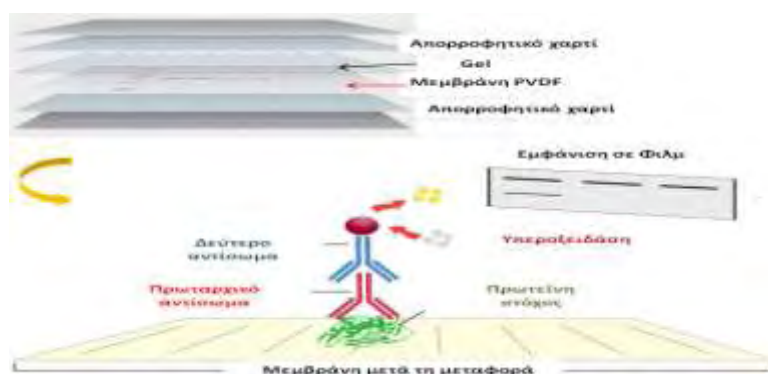
### B.1.5.2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα κάτωθι στάδια:

- ☐ Στήσιμο της συσκευής.
- ☐ Προσθήκη 600ml Running Buffer στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής καθώς επίσης και άλλα 200ml στο μέσω αυτής.
- ☐ Τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στη μία άκρη αυτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.
- ☐ Ηλεκτροφόρηση στα 200V και 120mA για 50min.
- ☐ Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση.

### B.1.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση κατά Western επιτρέπει την ανίχνευση μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η μεταφορά τους (με αποτύπωση, κυρίως ανοσοαποτύπωση) σε μια επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη PVDF ( Polybinylidene Fluoride membrane, Millipore, USA), που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Σήμανση του δεύτερου αντισώματος με ραδιενέργεια ή με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP) δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογραφία), που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της υπό μελέτης πρωτεΐνης (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη PVDF με ηλεκτροαποτύπωση ακολουθούνται τα κάτωθι στάδια:

- ☐ Η μεμβράνη PVDF επώάζεται για 2min σε μεθανόλη με σκοπό να ενεργοποιηθεί.
- ☐ Τα χαρτιά Whitman, η μεμβράνη και το gel επωάζονται σε Transfer Buffer για 10min.
- ☐ Κατασκευάζεται το sandwich ως εξής:
  - 2 χαρτάκια Whitman
  - 1 μεμβράνη PVDF
  - Gel
  - 2 χαρτάκια Whitman
- ☐ Ακολούθως το sandwich μεταφέρεται στην ειδική συσκευή για Semi-dry Transfer.
- ☐ Η ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται στα 15V για 30min.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, ακολουθεί βάνισμο της μεμβράνης με Ponceau μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολουθούν διαδοχικά ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS-T (1 φοράx15min και 3φορέςx5min). Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε TBS-T) ολονύκτια για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.

- ☐ Έπειτα η μεμβράνη επώζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε πρωταρχικό αντίσωμα (Πίνακας 1) στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5%γ γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C.
- ☐ Απομάκρυνση του πρωταρχικού αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος.
- ☐ Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5%γ γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- ☐ Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.
- ☐ Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 1min σε 10ml διαλύματος λουμινόλης

(1.25mM σε 0.1M Tris-Cl pH=8.5), στο οποίο προστέθηκαν 10μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100μl κουμαρικού οξέος. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ, δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-άμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύφθηκε με διάφανη μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ. Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης. Συγκεκριμένα, 3min επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης-Kodak και 3min στο διάλυμα σταθεροποίησης-Kodak και 3min στο νερό.

**Πίνακας 1 :** Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

<b>Αντίσωμα</b>	<b>Αραίωση</b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Εταιρεία</b>
<b><math>\alpha</math>-SM</b>	1:1000	mouse monoclonal goat anti-mouse	Sigma
<b>Vimentin</b>	1:1000	rabbit monoclonal goat anti-rabbit	Abcam
<b>GAPDH</b>	1:1000	mouse monoclonal goat anti-mouse	Calbiochem
<b>OPN</b>	1:1000	rabbit polyclonal goat anti-rabbit	Santa Cruz

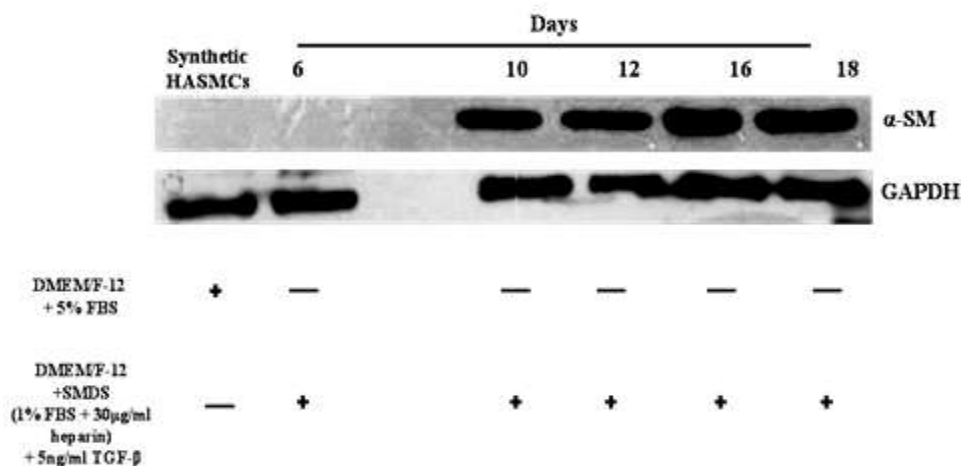


## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1 Πρωτεϊνική έκφραση της $\alpha$ -SM σε καλλιεργημένα SMCs αορτής

Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αορτικά SMCs που καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό μεγάλης περιεκτικότητας σε FBS (5% v/v) εμφανίζουν τον συνθετικό φαινότυπο, ενώ καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία μικρής συγκέντρωσης FBS προάγει τον συσταλτικό φαινότυπο των SMCs. Προκειμένου να επάγουμε τον συσταλτικό φαινότυπο των SMCs σε καλλιέργεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης, αποτελούμενο από 1% SMDS (1% v/v FBS, 30  $\mu$ g/ml ηπαρίνη) και από 5ng/ml TGF- $\beta$ , για χρονικό διάστημα 6 έως 18 ημερών.

Σε ένα πρώτο στάδιο αυτής της μελέτης εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -SM, η οποία αποτελεί το βασικότερο δείκτη του συσταλτικού φαινοτύπου των SMCs. Παρατηρήσαμε διαφοροποιημένη έκφραση της  $\alpha$ -SM και ειδικότερα σταδιακή αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής, μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό με 5% FBS σε σύγκριση με τα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης, αποτελούμενο από 1% FBS και 5ng/ml TGF- $\beta$ .



**Εικόνα 11:** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -SM σε HASMCs έπειτα από επίδραση με 1% SMDS και 5ng/ml TGF- $\beta$  σε χρονικό διάστημα 6, 10, 12, 16 και 18 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

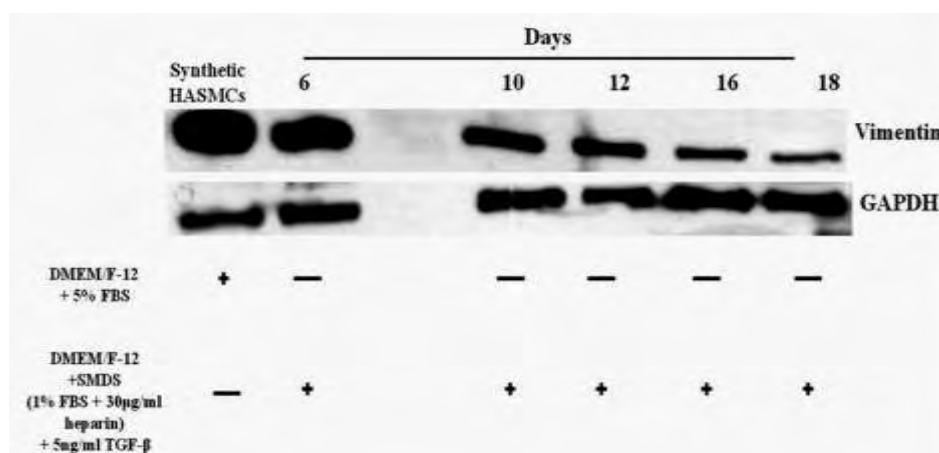
Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -SM μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό και εμφανίζουν τον συνθετικό φαινότυπο και της 6<sup>ης</sup> ημέρας καλλιέργειας των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -SM μετά

την 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία SMDS και TGF- $\beta$ , ενώ μεγαλύτερη αύξηση στην πρωτεϊνική της έκφραση παρατηρείται μετά από χρονικό διάστημα 16-18 ημερών καλλιέργειας στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Αντίθετα, διαφορές στην έκφραση της  $\alpha$ -SM δεν παρατηρούνται μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας, καθώς επίσης και μεταξύ 16<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας (Εικόνα 11).

## Γ.2 Πρωτεϊνική έκφραση της βιμεντίνης σε καλλιεργημένα SMCs αορτής

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση της βιμεντίνης, που αποτελεί δείκτη του συνθετικού φαινότυπου, προκειμένου να ελέγχουμε τον φαινότυπο των SMCs σε καλλιέργεια. Παρατηρήσαμε διαφοροποιημένη έκφραση της βιμεντίνης και ειδικότερα προοδευτική μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής, μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό με 5% FBS σε σύγκριση με τα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης, αποτελούμενο από 1% FBS και 5ng/ml TGF- $\beta$ .

Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε μικρή μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της βιμεντίνης μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό και εμφανίζουν το συνθετικό φαινότυπο και της 6ης ημέρας καλλιέργειας των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της βιμεντίνης, μετά την 10η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία SMDS και TGF- $\beta$ , ενώ μεγαλύτερη μείωση στην πρωτεϊνική της έκφραση παρατηρείται μετά από χρονικό διάστημα 16-18 ημερών καλλιέργειας στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Αντίθετα, διαφορές στην έκφραση της βιμεντίνης δεν παρατηρούνται μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας, καθώς επίσης και μεταξύ 16<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας (Εικόνα 12).

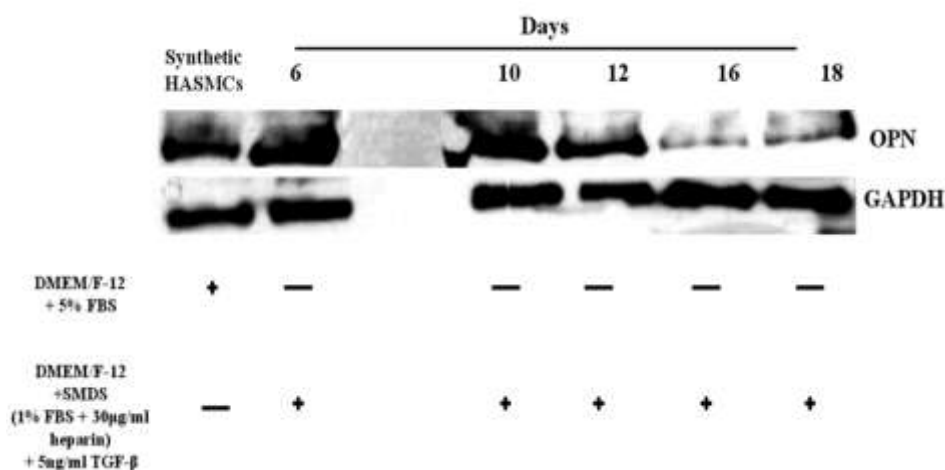


**Εικόνα 12:** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της βιμεντίνης σε HASMCs έπειτα από επίδραση με 1% SMDS και 5ng/ml TGF- $\beta$  σε χρονικό διάστημα 6, 10, 12, 16 και 18 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

### Γ.3 Πρωτεϊνική έκφραση της οστεοποντίνης (OPN) σε καλλιεργημένα SMCs αορτής.

Τέλος, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της OPN, η οποία αποτελεί έναν επιπλέον δείκτη του συνθετικού φαινοτύπου. Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα με εκείνα που προέκυψαν από την μελέτη της βιμεντίνης. Παρατηρήσαμε διαφοροποιημένη έκφραση της OPN και ειδικότερα σταδιακή μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής, μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, σε σύγκριση με τα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης.

Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της OPN μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό και εμφανίζουν τον συνθετικό φαινότυπο και της 6<sup>ης</sup> ημέρας καλλιέργειας των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της OPN μετά την 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία SMDS και TGF- $\beta$ , ενώ έντονα μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση της OPN παρατηρείται μετά από χρονικό διάστημα 16-18 ημερών καλλιέργειας στο θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης. Αντίθετα, διαφορές στην έκφραση της OPN, δεν παρατηρούνται μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας, καθώς επίσης και μεταξύ 16<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας (Εικόνα 13).



**Εικόνα 12:** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της OPN σε HASMCs έπειτα από επίδραση με 1% SMDS και 5ng/ml TGF- $\beta$  σε χρονικό διάστημα 6, 10, 12, 16 και 18 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αορτή και οι άλλες συστηματικές αρτηρίες έχουν παχιά τοιχώματα, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες ελαστικού ιστού και λείων μυϊκών ινών (SMCs). Τα SMCs χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία όσο αφορά το φαινότυπό τους και συγκεκριμένα συναντώνται σε δύο διακριτούς φαινοτύπους, τον συσταλτικό και το συνθετικό φαινότυπο. Τα SMCs που συναντώνται φυσιολογικά στο μεσαίο χιτώνα του αορτικού τοιχώματος, παρουσιάζουν το συσταλτικό φαινότυπο ο οποίος σύμφωνα με έρευνες θεωρείται ο διαφοροποιημένος φαινότυπος του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Ο συσταλτικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα, καθώς επίσης τα SMCs αυτού του φαινοτύπου παρουσιάζουν ατρακτοειδή μορφολογία και εκφράζουν υψηλά επίπεδα χαρακτηριστικών πρωτεϊνών των συγκεκριμένων κυττάρων, όπως η  $\alpha$ -SM.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις της αορτής, τα SMCs έχουν τη δυνατότητα να υφίστανται μεταβολές στο φαινότυπο τους. Αυτή η φαινοτυπική διαφοροποίηση προκύπτει ως απάντηση σε ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον εντός του τοιχώματος της αορτής με αποτέλεσμα να επιτυγχάνουν την ευελιξία, η οποία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική λειτουργία τους. Αποτέλεσμα των παραπάνω, είναι τα SMCs να υιοθετούν έναν αποδιαφοροποιημένο φαινότυπο, τον συνθετικό. Ο συνθετικός φαινότυπος σε αντίθεση με τον συσταλτικό, χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, ρομβοειδή μορφολογία καθώς επίσης και μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων χαρακτηριστικών του συσταλτικού φαινοτύπου. Επιπλέον, χαρακτηριστικό του συνθετικού φαινοτύπου είναι η αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα SMCs να μετατοπίζονται από τον μεσαίο χιτώνα στον έσω χιτώνα ενός παθολογικού αορτικού τοιχώματος.

Αυτή η φαινοτυπική πλαστικότητα που επιδεικνύουν τα SMCs, φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως η αθηρωμάτωση. Συγκεκριμένα, η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι τα ώριμα SMCs του μεσαίου χιτώνα, μετά από έκθεση σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες και φλεγμονώδεις μεσολαβητές, τροποποιούνται φαινοτυπικά, αποκτούν συνθετικό φαινότυπο και μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο. Εκεί εγκαθίστανται και υπερεκφράζουν υποδοχείς πρόσληψης λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη

συσσώρευση υπερβολικών ποσοτήτων χοληστερινικών εστέρων στα SMCs και κατ' επέκταση τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.

Τα παραπάνω γεγονότα εξηγούν το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με τους μηχανισμούς που ενέχονται στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των SMCs. Έτσι ερευνητικό στόχο αποτελεί η εύρεση του μηχανισμού με τον οποίο τα SMCs του συνθετικού φαινοτύπου μπορούν να επαναδιαφοροποιηθούν και να επανέλθουν στο φυσιολογικό συσταλτικό φαινότυπο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες SMCs που απομονώθηκαν από το μεσαίο χιτώνα φυσιολογικής αορτής. Τα SMCs καλλιεργήθηκαν για 18 ημέρες σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης που αποτελείται από εμπορικά διαθέσιμο SMDS (1% v/v FBS, 30  $\mu\text{g/ml}$  ηπαρίνη) και από 5ng/ml αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$  τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την επαγωγή του συσταλτικού φαινοτύπου σε πρωτογενείς καλλιέργειες SMCs.

Ειδικότερα, έρευνες υποδεικνύουν ότι ο TGF- $\beta$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του φαινοτύπου των SMCs καθώς σύμφωνα με έρευνες επάγει το συσταλτικό φαινότυπο των SMCs, αυξάνοντας την έκφραση πρωτεϊνών-δεικτών χαρακτηριστικών του φαινοτύπου, μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Rho-ROCK καθώς επίσης και των σηματοδοτικών μορίων Smad2 και Smad3. Επίσης μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ποντικού υποστηρίζουν ότι όταν τα SMCs καλλιεργηθούν σε θρεπτικό υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε FBS, εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και τον συνθετικό φαινότυπο των SMCs. Αντίθετα, τα SMCs που καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό χαμηλής συγκέντρωσης FBS, παρουσιάζουν τον συσταλτικό φαινότυπο των SMCs και συνεπώς μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση των παραπάνω παραγόντων στον φαινότυπο των SMCs, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών χαρακτηριστικών των δύο φαινοτύπων των SMCs. Αρχικά, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης  $\alpha$ -SM που αποτελεί τον κυριότερο πρωτεϊνικό δείκτη του συσταλτικού φαινοτύπου των SMCs. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε διαφοροποιημένη έκφραση της  $\alpha$ -SM μεταξύ των SMCs που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό με 5% FBS, σε σύγκριση με τα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης με 1% FBS και TGF- $\beta$ . Πιο αναλυτικά, δεν παρατηρήθηκε πρωτεϊνική έκφραση της  $\alpha$ -SM στα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 5% FBS, ενώ η  $\alpha$ -SM άρχισε να εκφράζεται σταδιακά μετά το πέρας 10 ημερών, στα SMCs που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης και TGF- $\beta$ , παρουσιάζοντας την υψηλότερη πρωτεϊνική έκφραση τη

18<sup>η</sup> ημέρα. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν τις πρώτες ενδείξεις ότι καλλιέργεια των SMCs παρουσία του αυξητικού παράγοντα TGF-β και χαμηλής περιεκτικότητας FBS μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων προς το συσταλτικό φαινότυπο.

Στη συνέχεια, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τη διαφοροποίηση των SMCs προς τον συσταλτικό φαινότυπο, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της βιμεντίνης και της οστεοποντίνης. Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η βιμεντίνη και οστεοποντίνη παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε SMCs του συνθετικού φαινοτύπου συγκριτικά με αυτά του συσταλτικού φαινοτύπου, καθιστώντας τις δύο αυτές πρωτεΐνες δείκτες του συνθετικού φαινοτύπου των SMCs. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της βιμεντίνης και της οστεοποντίνης από την 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης και TGF-β, έως και την 18<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, δηλαδή κατά το χρονικό διάστημα που παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της α-SM. Τα παραπάνω αποτελέσματα όσο αφορά την έκφραση της βιμεντίνης και της οστεοποντίνης ενισχύουν την υπόθεσή μας ότι όταν τα SMCs καλλιεργηθούν παρουσία του αυξητικού παράγοντα TGF-β και χαμηλής περιεκτικότητας FBS αρχίζουν σταδιακά να διαφοροποιούνται και να αποκτούν το συσταλτικό φαινότυπο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, εξαιρετικά δύσκολη είναι η καλλιέργεια SMCs του συσταλτικού φαινοτύπου που συναντάται σε φυσιολογική αορτή, καθώς τα κύτταρα αυτά σε καλλιέργεια αποκτούν τον αποδιαφοροποιημένο συνθετικό φαινότυπο των SMCs. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να παρεμποδίζεται η μελέτη του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου των SMCs και κατ'επέκταση η εύρεση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαφοροποίησή τους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, εξυπηρετούν την ανάγκη για τη δημιουργία μοντέλων σε καλλιέργεια που προσομοιάζουν την *in vivo* κατάσταση. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι έπειτα από καλλιέργεια των SMCs, με θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας FBS και TGF-β για το κατάλληλο χρονικό διάστημα, μπορούμε να επιτύχουμε την επαναδιαφοροποίηση των SMCs. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτή, η μελέτη των δύο φαινοτύπων των SMCs, με απώτερο στόχο τη διερεύνηση γονιδίων που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ αυτών.

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες έτσι ώστε να διευκρινιστούν οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην φαινοτυπική διαφοροποίηση των SMCs από τον συσταλτικό προς το συνθετικό φαινότυπο. Στόχος των μελλοντικών ερευνών είναι η επαναφορά των SMCs στον συσταλτικό φαινότυπο που συναντάται σε ένα φυσιολογικό αγγείο. Απώτερος σκοπός αυτών των ερευνών είναι ο σχεδιασμός νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν αφενός στη διατήρηση των SMCs στον συσταλτικό φαινότυπο

και αφετέρου στην καταστολή της φαινοτυπικής τους διαφοροποίησης προς το συνθετικό φαινότυπο, με στόχο την αντιμετώπιση παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allahverdian S, Francis GA. **Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells.** *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20(3):96-102.

Bascands JL, Girolami JP, Troly M, Escargueil-Blanc I, Nazzal D, Salvayre R, Blaes N. **Angiotensin II induces phenotype-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells.** *Hypertension* 2001;38:1294-9.

Batetta B, Mulas MF, Petruzzo P, Putzolu M, Bonatesta RR, Sanna F, Cappai A, Brotzu A, Dessiet S. **Opposite pattern of MDR1 and caveolin-1 gene expression in human atherosclerotic lesions and proliferating human smooth muscle cells.** *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1113–1120.

Birukov KG, Bardy N, Lehoux S, Merval R, Shirinsky VP, Tedgui A. **Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:922-7.

Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova OV. **Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells.** *Mol Cell Biochem* 1995;144:131-9.

Bochaton-Piallat ML, Clowes AW, Clowes MM, Fischer JW, Redard M, Gabbiani F, Gabbiani G. **Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:949-54.

Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G. **Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:815-20.

Campbell JH, Popadyne L, Nestel PJ, Campbell GR. **Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. Influence of phenotype.** *Atherosclerosis* 1983;47:279–295.

Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. **The smooth muscle cell in culture.** *Physiol Rev* 1979;59:1-61.

Chen S, Gardner DG. **Retinoic acid uses divergent mechanisms to activate or suppress mitogenesis in rat aortic smooth muscle cells.** *J Clin Invest* 1998;102:653-62.

Choi HY, Rahmani M, Wong BW, Allahverdian S, McManus BM, Pickering JG, Chan T, Francis GA. **ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells.** *Circulation* 2009;119:3223-3231



Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, Gabbiani G. **Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation.** *Circ Res* 1999;85:99-107.

Christen T, Verin V, Bochaton-Piallat M, Popowski Y, Ramaekers F, Debruyne P, Camenzind E, van Eys G, Gabbiani G. **Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery.** *Circulation* 2001;103:882-8.

Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. **Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus.** *Circ Res* 1996;78:790-8.

Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. **From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model.** *Faseb J* 1997;11:905-15.

Engelse MA, Lardenoye JH, Neele JM, Grimbergen JM, Margreet R, Lamfers LM, Pannekoek H, Quax HA, de Vries JM. **Adenoviral activin a expression prevents intimal hyperplasia in human and murine blood vessels by maintaining the contractile smooth muscle cell phenotype.** *Circ Res* 2002;90:1128-34.

Evanko SP, Angello JC, Wight TN. **Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1004-13.

Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, Stenmark KR. **Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities.** *Circ Res* 1997;81:940-52.

Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE, **Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1589-94.

Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, Orekhov AN, Koteliansky VE, Smirnov VN. **Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9542-6.

Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. **Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1510-20.

Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. **Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1093-9.

Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK. **A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements.** *J Biol Chem* 1997;272:10948-56.

Hayashi K, Shibata K, Morita T, Iwasaki K, Watanabe M, Sobue K. **Insulin receptor substrate- 1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2004;279:40807-18.

Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. **Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells.** *J Cell Biol* 1988;107:307-19.

Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. **Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse.** *Development* 1999;126:3047-55.

Hipper A, Isenberg G. **Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells.** *Pflugers Arch* 2000; 440:19-27

Hocevar BA, Howe PH. **Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components.** *Methods Mol Biol* 2000;142: 55-65.

Ichii T, Koyama H, Tanaka S, Kim S, Shioi A, Okuno Y, Raines EW, Iwao H, Otani S, Nishizawa Y. **Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes involved in cellular responses and the pericellular matrix environment.** *Circ Res* 2001;88:460-7.

Johst U, Betsch A, Wiskirchen J, Schöber W, Vonthein R, Rinkert N, Kehlbach R, Claussen CD, Duda SH. **All-Trans and 9-cis Retinoid Acids Inhibit Proliferation, Migration, and Synthesis of Extracellular Matrix of Human Vascular Smooth Muscle Cells by Inducing Differentiation In Vitro.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:526-35.

Kingsley K, Huff JL, Rust WL, Carroll K, Martinez AM, Fitchmun M, Plopper GE. **ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1000-6.

Ko YS, Yeh HI, Haw M, Dupont E, Kaba R, Plenz G, Robenek H, Severs NJ. **Differential expression of connexin43 and desmin defines two subpopulations of medial smooth**

**muscle cells in the human internal mammary artery.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1669-80.

Kotani M, Fukuda N, Ando H, Hu WY, Kunimoto S, Saito S, Kanmatsuse K. **Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting PDGF A-chain mRNA specifically inhibits neointima formation in rat carotid artery after balloon injury.** *Cardiovasc Res* 2003;57:265-76.

Koyama N, Kinsella MG, Wight TN, Hedin U, Clowes AW. **Heparan sulfate proteoglycans mediate a potent inhibitory signal for migration of vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 1998;83:305-13.

Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Katoh H, Tsai RC, Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohkubo A, Takaku F. **cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis.** *J Biol Chem* 1991;266:3768-73.

Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. **Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions.** *Kidney Int.* 2003;63(6):2010-9.

Li S, Chow LH, Pickering JG. **Cell surface-bound collagenase-1 and focal substrate degradation stimulate the rear release of motile vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2000;275:35384-92.

Li S, Fan YS, Chow LH, Van Den Diepstraten C, van Der Veer E, Sims SM, Pickering JG. **Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery.** *Circ Res* 2001;89:517-25.

Li S, Sims S, Jiao Y, Chow LH, Pickering JG. **Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes.** *Circ Res* 1999; 85:338-48.

Li X, Van Putten V, Zarinetchi F, Nicks ME, Thaler S, Heasley LE, Nemenoff RA. **Suppression of smoothmuscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A2.** *Biochem J* 1997;327:709-16.

Lusis A. J. **Atherosclerosis** *Nature*. 2000;407:233–241.

Metz RP, Patterson JL, Wilson E. **Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization.** *Methods Mol Biol*. 2012;843:169-76.

Miano JM, Kelly LA, Artacho CA, Nuckolls TA, Piantedosi R, Blaner WS. **all-Trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric**

**remodeling of the rat carotid artery after balloon withdrawal injury.** *Circulation* 1998;98:1219-27.

Miano JM. **Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression.** *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:577-93.

Moiseeva EP. **Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions.** *Cardiovasc Res* 2001;52:372-86.

Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. **Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation.** *Immunol Lett* 2002;82:85-91.

Neuville P, Geinoz A, Benzonana G, Redard M, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G. **Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo.** *Am J Pathol* 1997;150:509-21.

O'Callaghan CJ, Williams B. **Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta.** *Hypertension*. 2000;36(3):319-24.

Owens GK., Kumar MS., Wamhoff BR. **Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease.** *Physiological Reviews* 2004; 84:767-801.

Pugsley MK, Tabrizchi R. **The vascular system. An overview of structure and function.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44:333-340.

Raines EW, Ferri N. **Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease.** *J Lipid Res*. 2005 46:1081-92.

Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, Owens GK. **Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury.** *J Clin Invest* 2000;106:1139-47.

Rensen SSM, Doevendans PAFM, van Eys GJJM. **Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity.** *Neth Heart J* 2007;15:100-8.

Reusch HP, Chan G, Ives HE, Nemenoff RA. **Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:239-44.

Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. **Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells.** *Circ Res.* 1996;79(5):1046-53.

Ross R. **Cell biology of atherosclerosis.** *Annu Rev Physiol* 1995; 57:791–804.

Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. **TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGFbeta knockout phenotypes.** *Development* 1997;124:2659-70.

Schattemann GC, Loushin C, Li T, Hart CE. **PDGF-A is required for normal murine cardiovascular development.** *Dev Biol* 1996;176: 133-42.

Schwartz SM & Murry CE. **Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions.** *Annu Rev Med* 1998;49:437–460.

Shah NM, Groves AK, Anderson DJ. **Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members.** *Cell* 1996;85:331-43.

Sinha S, Hoofnagle MH, Kingston PA, McCanna ME, Owens GK. **Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1560-8.

Soumian S, Albrecht C, Davies AH, Gibbs RG. **ABCA1 and atherosclerosis.** *Vasc Med.* 2005;10(2):109-19.

Stegemann JP, Nerem RM. **Phenotype modulation in vascular tissue engineering using biochemical and mechanical stimulation.** *Ann Biomed Eng.* 2003;31(4):391-402.

Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. **Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently.** *Cell Tissue Res* 1994;276:263-71.

Tran PK, Tran-Lundmark K, Soininen R, Tryggvason K, Thyberg J, Hedin U. **Increased intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in transgenic mice with heparan sulfate-deficient perlecan.** *Circ Res* 2004;94:550-8.

Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN. **Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor.** *Cell* 2001;105:851-62.

Wang Z, Rao PJ, Castresana MR, Newman WH. **TNF-alpha induces proliferation or apoptosis in human saphenous vein smooth muscle cells depending on phenotype.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H293-301.