



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ»

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ: Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ : Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ: Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS

MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS
“STEM CELL – DERIVED EXOSOMES ISOLATION AND CHARACTERIZATION”

ANTONIOU PINELOPI
BIOCHEMIST & BIOTECHNOLOGIST, BSc

LARISSA 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Οστεοαρθρίτιδα	9
1.2. Παθοφυσιολογία της ΟΑ	10
1.3. Ταξινόμηση και Παράγοντες κινδύνου	12
1.4. Κλινικοί Φαινότυποι	13
1.5. Γενετική της ΟΑ	14
1.6. Διάγνωση	17
1.7. Θεραπεία	18
1.7.1. Φαρμακευτική και χειρουργική θεραπεία της ΟΑ	18
1.7.2. Κυτταρική θεραπεία	19
1.8. Εξωσώματα: Διαμεσολαβητές διακυτταρικής επικοινωνίας	21
1.8.1. Γενικά	21
1.8.2. Βιογένεση εξωσωμάτων	23
1.8.3. Ταξινόμηση εξωσωμάτων	24
1.8.4. Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων	24
1.8.5. Ρόλος εξωσωμάτων - Γενικά	25
1.8.6. Ρόλος των εξωσωμάτων στην ΟΑ	27
1.8.7. Μη κυτταρική θεραπεία (cell – free therapy) με την χρήση εξωσωμάτων	27
1.8.8. Εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs	28
1.8.9. Περιορισμοί εξωσωμάτων	29
2. ΣΚΟΠΟΣ	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1. Είδη κυττάρων	31
3.2. Καλλιέργειες κυττάρων	31
3.3. Τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών	32
3.4. Απομόνωση εξωσωμάτων από ολικό RNA	35
3.5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης - TEM	36
3.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western blot	36

3.7. Υπολογισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford	38
3.8. Χρώση εξωσωμάτων.....	39
3.9. Wound Healing Assay – Scratch Assay	41
3.10. Επίδραση εξωσωμάτων προερχόμενα από iMSCs (treatment) σε OA χονδροκύτταρα	42
3.10.1. Απομόνωση ολικού RNA από οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα	43
3.10.2. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA – cDNA	46
3.10.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	47
3.10.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	49
3.11. Στατιστική Ανάλυση.....	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.1. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων.....	53
4.2. Έλεγχος μορφολογίας εξωσωμάτων – TEM.....	54
4.3. Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων – μελέτη έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών.....	54
4.4. Ποσοτικοποίηση εξωσωμάτων	56
4.5. Πρόσληψη εξωσωμάτων σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα	56
4.6. Wound Healing Assay – Scratch Assay	57
4.7. Προσδιορισμός μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των COL1A1, MMP-13, ACAN, ADAMTS-5, SOX9 και COMP σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μετά την επίδραση με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs	59
4.7.1. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης του COL2A1	60
4.7.2. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της ACAN	61
4.7.3. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης του SOX9	62
4.7.4. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της MMP-13	63
4.7.5. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της ADAMTS-5	64
4.7.6. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της COMP	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Γενετική του Ανθρώπου – Γενετική Συμβουλευτική» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Τσέζου Ασπασία για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, την πολύτιμη καθοδήγηση της, την άψογη συνεργασία και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Μου έδωσε την ευκαιρία να αποκτήσω γνώσεις πάνω σε ένα σύγχρονο αντικείμενο μελέτης της γενετικής και εφόδια για την μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο και την κα. Παπαθανασίου Ιωάννα για την συμμετοχή τους ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Η πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα Κοντελέ Βασίλη. Τον ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Εύη Μουρμούρα (Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια), την Αλίκη Παπαγεωργίου (Υποψήφια Διδάκτορας), την Γωγώ Σκουμπουρδή και την Μαρίνα Βαϊοπούλου (μέλη προσωπικού) για το γεγονός ότι ήταν πάντα πρόθυμες να βοηθήσουν και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε πάντα στον χώρο του εργαστηρίου. Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην συμφοιτήτρια και συνάδελφο μου Κουτεντάκη Γεωργία για την καθημερινή αλληλεπίδραση και υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου αυτή την περίοδο και με στήριξαν για να φέρω εις πέρας την διπλωματική μου εργασία.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACAN → Αγгреκάνη

COL2A1 → Κολλαγόνο τύπου II A1

COMP → Cartilage Oligometric Matrix Protein – Ολιγομερική πρωτεΐνη μήτρας χόνδρου

ECM → Εξωκυττάρια μήτρα/ουσία του χόνδρου

iMSCs → Μεσεγχυματικά προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα

iPSCs → Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα

MMP-13 → Μεταλλοπρωτεΐνάση 13

MSCs → Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

SOX9 → Sry-box transcription factor 9

OA → Οστεοαρθρίτιδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων με πολυπαραγοντικό χαρακτήρα, προσβάλλοντας κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Οι μέχρι τώρα διαθέσιμες θεραπείες στοχεύουν στην αντιμετώπιση των κλινικών συμπτωμάτων χωρίς να εμποδίζουν ή να αναστρέφουν την εξέλιξή της. Τις τελευταίες δεκαετίες πραγματοποιούνται μελέτες αντιμετώπισης της με κυτταρική θεραπεία, με την χρήση βλαστικών κυττάρων. Πρόσφατα, οι έρευνες έχουν στραφεί στην χρήση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα, iMSCs τα οποία παρουσιάζουν αναγεννητικές ικανότητες καθώς και στα μόρια που εκκρίνουν, τα εξωσώματα. Τα εξωσώματα αποτελούν ένα τύπο εξωκυτταρικών κυστιδίων και συμβάλλουν στην διακυτταρική επικοινωνία φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένης της ΟΑ. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων προερχόμενα από iMSCs με στόχο να διερευνηθεί ο πιθανός θεραπευτικός τους ρόλος στην ΟΑ. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, πραγματοποιήθηκε απομόνωση εξωσωμάτων από iMSCs (iMSCs-exos) και χαρακτηρισμός τους μέσω της εύρεσης και έμμεσης ποσοτικοποίησης χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών που βρίσκονται στην επιφάνεια τους όπως πχ CD63 και CD81. Στην συνέχεια, ακολούθησε μελέτη της επίδρασης των iMSCs-exos στην κυτταρική μετανάστευση φυσιολογικών χονδροκυττάρων και μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών της νόσου μετά την επίδραση iMSCs-exos σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε τρεις διαφορετικούς χρόνους, 24 ώρες, 48 ώρες και 5 μέρες. Από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε θετική ρύθμιση της έκφρασης «αναβολικών» γονιδίων όπως COL2A1, SOX9 και ACAN, ενώ για «καταβολικά» γονίδια MMP-13, ADAMTS-5 και COMP παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση τους. Ωστόσο, η μεταβολή των mRNA επιπέδων έκφρασής τους είναι παροδική, καθώς μετά τις 48 ώρες τα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων τείνουν να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα. Συμπερασματικά, τα εξωσώματα από iMSCs ρυθμίζουν την έκφραση χαρακτηριστικών γονιδίων της ΟΑ, συμβάλλοντας στη αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την ανάδειξη των τροποποιήσεων οι οποίες θα επιφέρουν μεγαλύτερης διάρκειας θεραπευτικά αποτελέσματα εντός της άρθρωσης.

Λέξεις κλειδιά: οστεοαρθρίτιδα, iMSCs, εξωσώματα, μη-κυτταρική θεραπεία, γονιδιακή ρύθμιση

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common degenerative joint disease with a multifactorial nature which mainly affects older people. The currently available treatments aim to manage clinical symptoms without preventing or reversing its progression. In recent decades, cell therapies, using stem cells have been carried out. Recently, research focuses in the use of mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells (iMSCs) showing regenerative abilities as well as in the molecules they secrete, the exosomes. Exosomes are a type of extracellular vesicles that contribute to intercellular communication in normal and pathological conditions, including OA. The aim of the present thesis is to isolate and characterize exosomes from iMSCs (iMSCs-exos) in order to test their potential therapeutic efficacy in OA therapy. To achieve this aim, exosomes were isolated from iMSCs and characterized by indirect quantification of characteristic surface protein markers as CD63 and CD81. In addition, the effect of iMSCs-exos on cell migration of normal chondrocytes and the expression of OA characteristic molecular markers at three different times, 24h, 48h and 5days were evaluated. Positive regulation of expression was observed in the mRNA expression levels of COL2A1, SOX9 και ACAN while negative regulation was observed in “catabolic genes” expression as MMP-13, ADAMTS-5 and COMP. However, it was found that the changes at the mRNA expression levels of the above mentioned genes were temporary, as they returned to the initial expression levels after 48h. In conclusion, it was shown that the expression of characteristic genes of OA is regulated by iMSCs –derived exosomes, contributing to the regeneration of articular cartilage. However, further studies are needed to investigate possible modifications that would prolong their action in the joint.

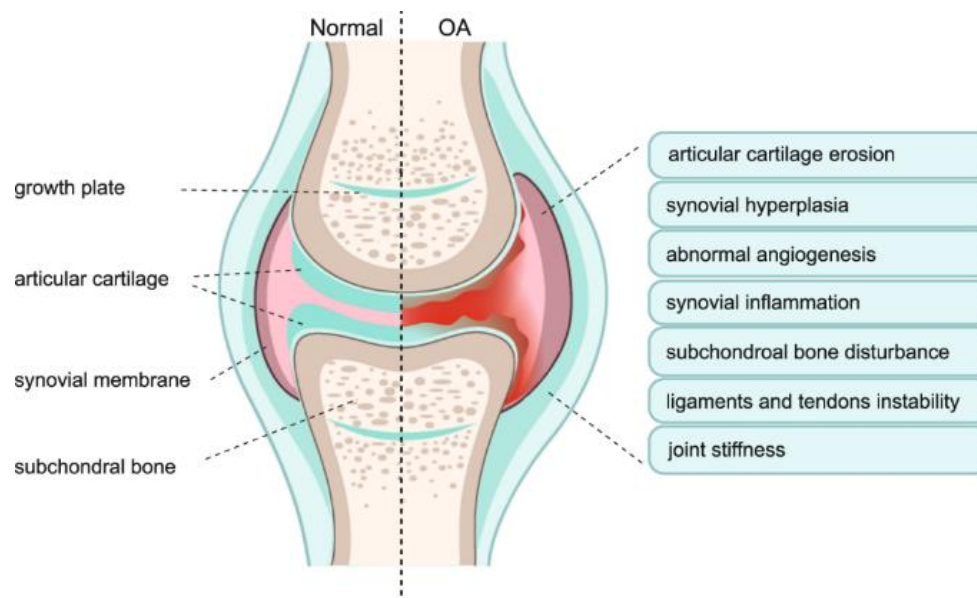
Key words: osteoarthritis, iMSCs, exosomes, cell – free therapy, gene regulation

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και την πιο συχνή μορφή αναπηρίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρόκειται για μία χρόνια, εκφυλιστική, μυοσκελετική διαταραχή, με πολυπαραγοντικό χαρακτήρα, η οποία επηρεάζει πάνω από 500 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, κυρίως άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών (*Yao et al., 2023*). Για αρκετά χρόνια, η οστεοαρθρίτιδα είχε θεωρηθεί ως μια ασθένεια «φθοράς» του αρθρικού χόνδρου της άρθρωσης με επακόλουθη φλεγμονή. Σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που εμπλέκονται τόσο μεταβολικοί και φλεγμονώδεις παράγοντες όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες (*Abramoff & Caldera, 2020*). Η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να προσβάλει όλες τις αρθρώσεις του σώματος οι οποίες χωρίζονται σε αυτές που στηρίζεται το σώμα (σπονδυλική στήλη, ισχίο και γόνατο) και σε αυτές που δεν στηρίζεται το σώμα (χέρι και δάκτυλα). Στους ενήλικες, η ΟΑ συνήθως προσβάλλει μόνο μια άρθρωση αλλά μπορεί να εμφανιστεί και σε περισσότερες από μία αρθρώσεις ταυτόχρονα (*Meliconi & Pulsatelli, 2019*). Χαρακτηρίζεται από ποικίλες παθολογικές εκδηλώσεις της άρθρωσης, οι κυριότερες των οποίων είναι ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, ο σχηματισμός οστεοφύτων, η ατροφία των μυών, η αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού, η υπερτροφία του αρθρικού υμένα και η δυσλειτουργία των συνδέσμων (*Ni et al., 2020*) (Εικόνα 1).

Η οστεοαρθρίτιδα αξιολογείται με βάση τα κλινικά της συμπτώματα. Τα πιο συνήθη κλινικά συμπτώματα αποτελούν η δυσκαμψία, οι πόνοι στις αρθρώσεις και η μειωμένη κινητικότητα, τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς, οδηγώντας σε ψυχολογικά και κοινωνικο-οικονομικά προβλήματα (*Abramoff & Caldera, 2020*). Έτσι, η ΟΑ αποτελεί σημαντικό ερευνητικό πεδίο για την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, κατανοώντας τους παθοφυσιολογικούς της μηχανισμούς με άμεσο στόχο την έγκαιρη διάγνωση και την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.



Εικόνα 1: Παθολογικά χαρακτηριστικά της άρθρωσης στην OA (Yao et al., 2023)

1.2. Παθοφυσιολογία της OA

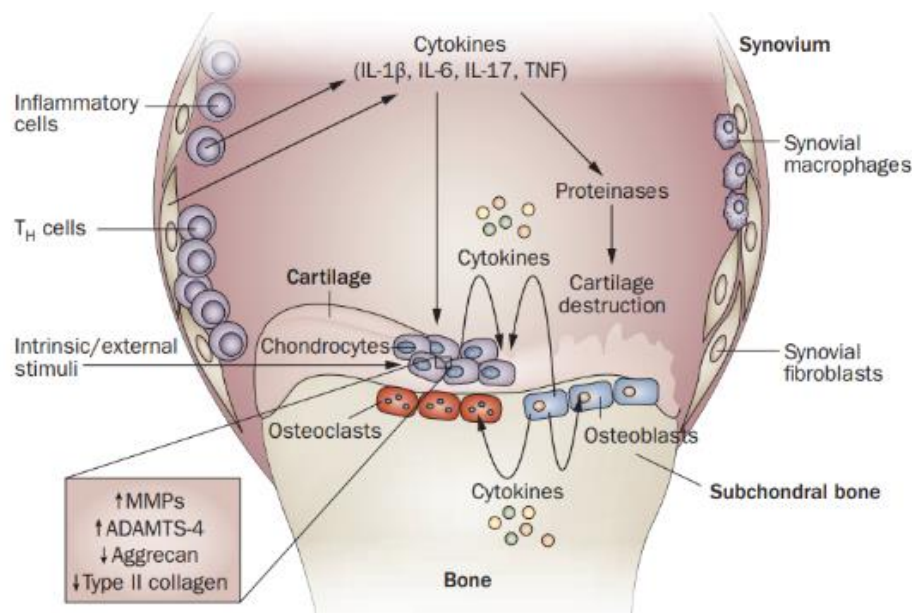
Η OA είναι μια χρόνια διαταραχή των αρθρώσεων που ξεκινά με βιοχημικές και κυτταρικές αλλοιώσεις στους ιστούς της άρθρωσης και οδηγεί σε ιστολογικές και δομικές αλλοιώσεις, καταλήγοντας σε δυσλειτουργία ολόκληρου του οργάνου (Yao et al., 2023). Χαρακτηρίζεται από προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου αλλά και φλεγμονή του αρθρικού υμένα, σχηματισμό οστεοφύτων, σκλήρυνση υποχόνδριου οστού (Charlier et al., 2019) και σχετίζεται άμεσα με την ακεραιότητα ολόκληρης της άρθρωσης, μέσω της μη διατήρησης της ομοιόστασης.

Ο χόνδρος αποτελείται από ένα μόνο τύπο κυττάρων, τα χονδροκύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου και περιβάλλονται από την εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix-ECM), η οποία προσδίδει στον χόνδρο την χαρακτηριστική αντοχή τους σε μηχανικές φορτίσεις. Η ECM αποτελείται από 70% νερό και το υπόλοιπο 30% αποτελείται από ουσίες που συμβάλλουν στην διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος των χονδροκυττάρων όπως αγγρεκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και διάφοροι τύποι κολλαγόνου (Primorac et al., 2020). Με την έναρξη της OA, τα χονδροκύτταρα υφίστανται πολλαπλές αλλαγές, όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό, τη βιωσιμότητα, αλλά και το προφίλ τους, με αποτέλεσμα ο αρθρικός χόνδρος να αλλοιώνεται σταδιακά. Στην προσπάθεια της επιδιόρθωσης των βλαβών, τα χονδροκύτταρα αποκτούν υπερτροφικό χαρακτήρα, αυξάνοντας την μεταβολική τους δραστηριότητα, οδηγώντας στην σύνθεση μορίων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, στην

παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων και σε αυξημένο πολλαπλασιασμό τους (*Charlier et al., 2019*).

Η φλεγμονή αποτελεί ένα από τα κύρια αίτια της ΟΑ. Η παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, φλεγμονωδών κυτοκινών, η παρουσία μακροφάγων, η αρθρική αγγειογένεση, η γήρανση των χονδροκυττάρων, το οξειδωτικό στρες, οι βλάβες στο DNA είναι μερικοί από τους παράγοντες που συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεση της ΟΑ (*Abramoff & Caldera, 2020*). Οι προφλεγμονώδης κυτοκίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη και στη εξέλιξη της νόσου, οι οποίες ενεργοποιούν ένα καταρράκτη βιολογικών διαδικασιών, όπως η αυτοφαγία, ο κυτταρικός θάνατος, η επαγωγή καταβολικών διεργασιών και η καταστολή αναβολικών διεργασιών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, TNF-α ελέγχουν την καταστροφή του αρθρικού χόνδρου επάγοντας την έκκριση ενζύμων αποδόμησης όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), μονοξείδιο του αζώτου (NO), προσταγλανδίνες και άλλες προφλεγμονώδης κυτοκίνες. Επιπλέον, η IL-1β αναστέλλει την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου (ECM), συμπεριλαμβανομένης της αγγρεκάνης και του κολλαγόνου τύπου II (*Charlier et al., 2019*).

Αναλυτικότερα, στα πρώιμα στάδια της ΟΑ, η ECM αρχίζει να υφίσταται αλλαγές επαγόμενες από τα ένζυμα που διασπούν την αγγρεκάνη, όπως τις ADAMTS-4 και ADAMTS-5. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα χονδροκύτταρα να αυξάνουν τις συνθετικές τους αντιδράσεις με σκοπό την επιδιόρθωση αυτών των αλλαγών. Στην προσπάθεια τους αυτή, τα χονδροκύτταρα αποκτούν υπερτροφικό χαρακτήρα και παρατηρείται αυξημένη έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών MMPs, οι οποίες συμβάλλουν κι αυτές στην αποικοδόμηση της ECM. Η αποικοδόμηση της ECM έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των μηχανισμών επιβίωσης, την ασβεστοποίηση και την απόπτωση. Συγκεκριμένα, παρατηρείται εναπόθεση περισσότερου ασβεστίου στην ECM, αύξηση των καταβολικών διεργασιών και απορρύθμιση της δράσης των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών στον υποχόνδριο οστό, οδηγώντας σε δομικές αλλοιώσεις του. Τέλος, προκαλείται σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, σχηματισμός οστεοφύτων και δημιουργία κυστών (*Primorac et al., 2020*).



Εικόνα 2: Παθοφυσιολογία της OA (Kapoor et al., 2011)

1.3. Ταξινόμηση και Παράγοντες κινδύνου

Η OA μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα τις αιτίες εκδήλωσής της (Abramoff & Caldera, 2020):

1. Πρωτοπαθής
2. Δευτεροπαθής: μετα-τραυματική OA, ως αποτέλεσμα τραυματισμού της άρθρωσης

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ως παράγοντας κινδύνου θεωρείται οποιοδήποτε χαρακτηριστικό, κατάσταση ή συμπεριφορά που μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: α) στους μη τροποποιήσιμους και β) στους τροποποιήσιμους (Johnson & Hunter, 2014).

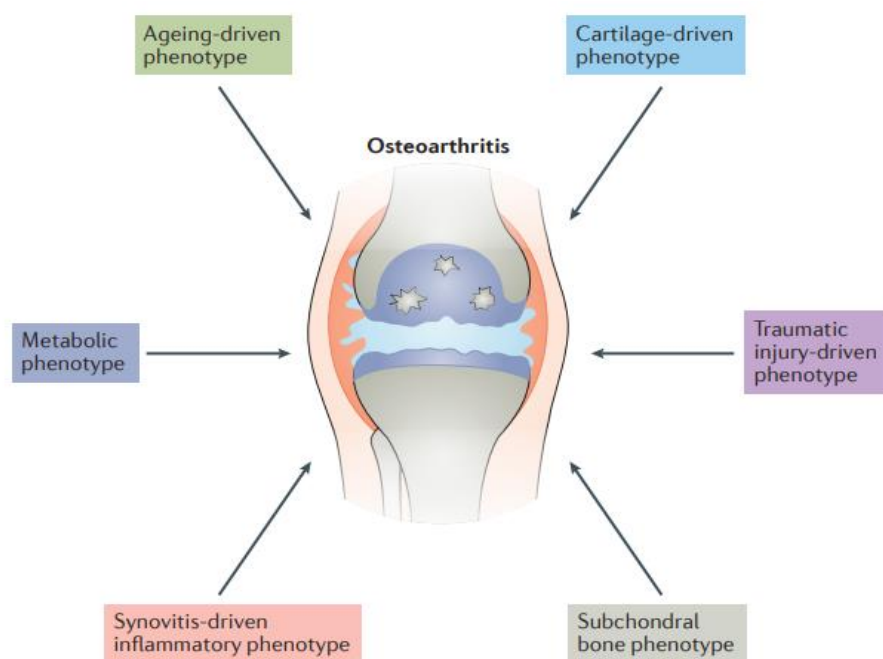
Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου της OA συμπεριλαμβάνεται η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα και η γενετική συνιστώσα. Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι όσο αυξάνεται η ηλικία, αυξάνεται και η πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου κυρίως σε ενήλικες άνω των 60 ετών (Sacitharan, 2019) καθώς και ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες παρά στους άντρες άνω των 55 ετών στην εμμηνόπαυση, λόγω της μειωμένης παραγωγής οιστρογόνων (Abramoff & Caldera, 2020; Bortoluzzi et al., 2018; Sacitharan, 2019).

Επιπλέον, η εμφάνιση της νόσου φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ συγκριτικά με την Ασία και την Αφρική (Abramoff & Caldera, 2020). Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται περισσότερα από 80 γονίδια, πάνω από 230 γενετικοί τόποι και παραλλαγές τους καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα miRNAs (Abramoff & Caldera, 2020).

Στους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου εμπλέκεται η παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο, η έντονη αθλητική δραστηριότητα ή εργασία οι οποίες ασκούν έντονες μηχανικές πιέσεις στις αρθρώσεις, οι «κακές» διατροφικές συνήθειες οι οποίες οδηγούν σε φλεγμονή και τέλος, ο τραυματισμός της άρθρωσης σε μικρή ηλικία (Vina & Kwoh, 2018).

1.4.Κλινικοί Φαινότυποι

Η ΟΑ θεωρείται ετερογενής νόσος με διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους οι οποίοι προκύπτουν από πολύπλοκους παθολογικούς μηχανισμούς. Οι έξι κύριοι κλινικοί φαινότυποι της ΟΑ απεικονίζονται στην Εικόνα 3 και αποτελούν τον μεταβολικό φαινότυπο, τον ηλικιο– συσχετιζόμενο φαινότυπο, το μετα-τραυματικό, το συσχετιζόμενο με το υποχόνδριο οστό και τον φλεγμονώδη φαινότυπο (Mobasheri et al., 2017; Vina & Kwoh, 2018).



Εικόνα 3: Κλινικοί φαινότυποι της ΟΑ (Mobasheri et al., 2017)

1.5.Γενετική της ΟΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αύξηση των καταβολικών διεργασιών οδηγεί σε μεταβολές της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας στην παθογένεια της άρθρωσης. Τα γονίδια μπορούν να χωριστούν σε αυτά που συμμετέχουν στις αναβολικές διεργασίες και σε αυτά που συμμετέχουν στις καταβολικές διεργασίες.

Τα σημαντικότερα «αναβολικά» γονίδια είναι το κολλαγόνο τύπου 2A1 (*COL2A1*), η αγγρεκάνη (*ACAN*) και το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα SOX9 (*SOX9*), τα οποία συμβάλλουν στην χονδρογένεση και στην συνολική διατήρηση της ομοιόστασης της άρθρωσης. Τα σημαντικότερα «καταβολικά» γονίδια είναι η μεταλλοπρωτεΐνάση *MMP-13*, η αγγρεκανάση *ADAMTS-5* και το γονίδιο που κωδικοποιεί την ολιγομερική πρωτεΐνη της μήτρας του χόνδρου *COMP*, τα οποία συμβάλλουν στην καταστροφή της άρθρωσης. Η αλληλεπίδραση των γονιδίων και μερικά από τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην πάθηση παρουσιάζονται στην Εικόνα 4. Τα γονίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πιθανοί βιοδείκτες τόσο για την πρόγνωση όσο και για την διάγνωση της ΟΑ στα πρώιμα στάδια.

«Αναβολικά» γονίδια»: γονίδια που συμμετέχουν στις αναβολικές διεργασίες

Το κολλαγόνο τύπου 2A1 (*COL2A1*) αποτελεί το βασικό δομικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας (ECM). Παράγεται από τα χονδροκύτταρα, προάγει την χονδρογένεση (δείκτης διαφοροποίησης) και παρέχει σε μεγάλο ποσοστό την στήριξη και την αντοχή του χόνδρου (*Fujii et al., 2022; Yassin et al., 2020*). Η έκφραση του επάγεται από τον παράγοντα μεταγραφής SOX9, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως ο κύριος παράγοντας χονδρογένεσης. Διασπάται από τις MMPs (*MMP-1, MMP-8, MMP-13*) (*Kapoor et al., 2011 ; Primorac et al., 2020 ; Yassin et al., 2020*).

Ο μεταγραφικός παράγοντας SRY-Box 9 (SOX9) είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Sox που χαρακτηρίζονται από μια περιοχή HMG-box με την οποία μπορούν να συνδεθούν στο DNA. Ο SOX9 εκφράζεται νωρίς στο έμβρυο και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του χόνδρου καθώς προάγει τον σχηματισμό και την ανάπτυξη του χόνδρου και τον σχηματισμό του σκελετού. Επάγει την έκφραση του *COL2A1* στα προγονικά χονδροκύτταρα έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν σε ώριμα χονδροκύτταρα. Εκφράζεται σε ιστούς του χόνδρου πριν την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Μειωμένη έκφραση του SOX9 οδηγεί σε αναστολή της

έκφρασης του COL2A1 με αποτέλεσμα την δημιουργία σκελετικών ανωμαλιών (*Fujii et al., 2022*).

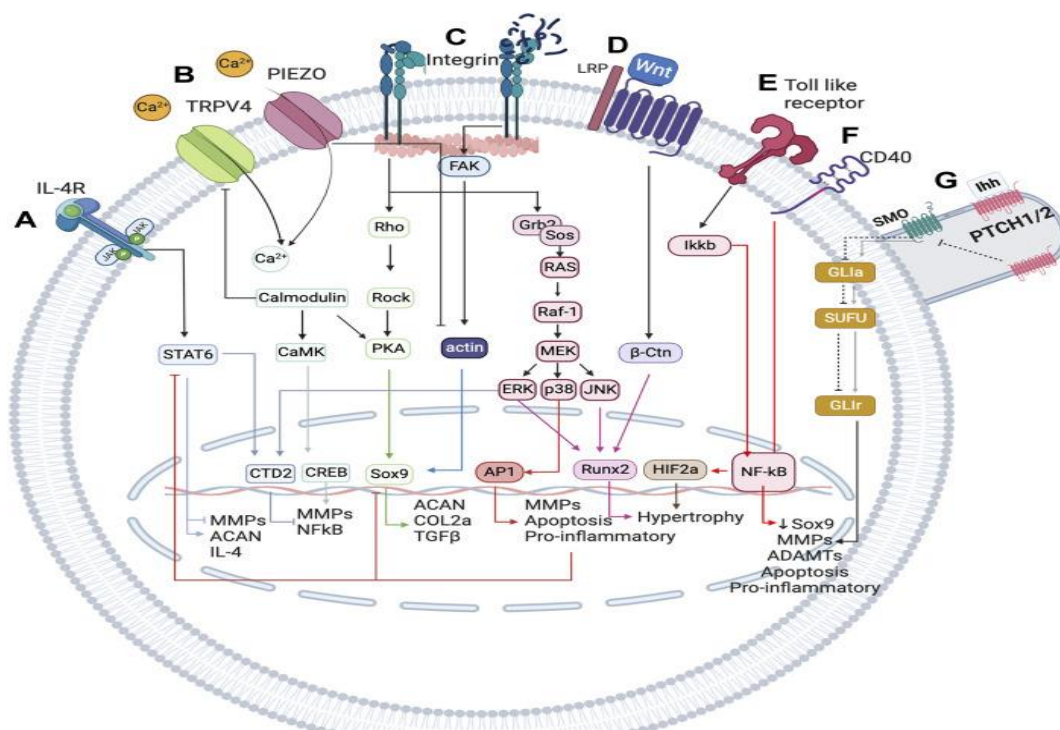
Η αγγρεκάνη (ACAN) είναι η κύρια πρωτεογλυκάνη του χόνδρου και εκφράζεται από τα χονδροκύτταρα. Πρωταρχικός της στόχος είναι η προστασία του κολλαγόνου από την αποικοδόμηση του καθώς επίσης, συμβάλλει και στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων. Σχηματίζει σύμπλεγμα με άλλες πρωτεογλυκάνες (θειική χονδροϊτίνη και θειική κερατάνη) και με το υαλουρονικό οξύ, σχηματίζοντας ένα δίκτυο στη ECM του χόνδρου. Αυτό το σύμπλεγμα είναι διάσπαρτο στα ινίδια κολλαγόνου της ECM, σχηματίζοντας έτσι την χαρακτηριστική δομή γέλης του χόνδρου. Με αυτόν τον τρόπο, προσδίδει την ικανότητα του χόνδρου να αντιστέκεται στις πιέσεις (*Porter et al., 2005*). Η ACAN διασπάται κυρίως από τις ADAMTS-4 και ADAMTS-5 και η αποδόμηση της αποτελεί ένα σημαντικό γεγονός στα πρώιμα στάδια της OA (*Fujii et al., 2022; Li et al., 2022*).

«Καταβολικά» γονίδια»: γονίδια που συμμετέχουν στις καταβολικές διεργασίες

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι ένζυμα που μπορούν να αποικοδομήσουν όλα τα μόρια της ECM. Εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Συμμετέχουν τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η επούλωση πληγών, η φλεγμονή αλλά και στον καρκίνο. Η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-13 παράγεται από χονδροκύτταρα και ινοβλάστες, εκφράζεται στον χόνδρο και ευθύνεται για την καταστροφή της ECM και του αρθρικού χόνδρου στην OA. Είναι διαλυτή κολλαγενάση και διασπά κυρίως το κολλαγόνο τύπου 2 αλλά και άλλους τύπους κολλαγόνου σε μικρότερη συχνότητα. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της παρατηρούνται από τα πρώιμα στάδια της νόσου (*Hu & Ecker, 2021*). Εκτός του κολλαγόνου, η MMP-13 συμβάλει και στην αποικοδόμηση της αγγρεκάνης καθώς και στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως του TCF3. Μελέτες έχουν δείξει ότι η MMP-13 εκφράζεται και από φυσιολογικά χονδροκύτταρα, η οποία όμως ενδοκυτταρώνεται και αποικοδομείται γρήγορα από αυτά, δηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο της αυτοφαγίας στην αυτορρύθμιση της. Έχουν διερευνηθεί διάφοροι τρόποι επιλεκτικής αναστολής της μέσω αναστολέων που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην θεραπεία της OA (*Hu & Ecker, 2021; Mehana et al., 2019*).

Οι ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) είναι μια σύνθετη ομάδα ενζύμων μεταλλοπρωτεϊνών που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ΟΑ. Τα κύρια μελετημένα γονίδια στην ΟΑ είναι τα ADAMTS-4 και το ADAMTS-5, πρωταρχικός ρόλος των οποίων είναι η διάσπαση της αγγρεκάνης (αγγρεκανάσες). Η ADAMTS-5 εκφράζεται τόσο σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα όσο και σε υγιή. Οι διάφορες αλλοιώσεις που συμβαίνουν στον υποχόνδριο οστό και στα χονδροκύτταρα κατά την εξέλιξη της ΟΑ, επάγουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του, οδηγώντας στην διάσπαση της αγγρεκάνης, ενισχύοντας τον εκφυλισμό του χόνδρου και τελικά στην εξέλιξη της ΟΑ (*Li et al., 2022*). Επιπλέον, μπορεί να συμβάλλει και στην αποικοδόμηση πρωτεογλυκάνων που εκφράζονται στα αιμοφόρα αγγεία και στο νευρικό σύστημα (*Porter et al., 2005*).

Η ολιγομερική πρωτεΐνη μήτρας χόνδρου (COMP) είναι μια πρωτεΐνη της ECM και εκφράζεται σε όλες τις στοιβάδες του χόνδρου καθώς και στο δέρμα και στα σπλάχνα. Σε φυσιολογικά επίπεδα του, το COMP συμβάλλει στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση και προάγει την σύνθεση του κολλαγόνου τύπου II, XII και των πρωτεογλυκάνων, ενώ αναστέλλει το κολλαγόνο τύπου I και X, διατηρώντας την ομοιότητα της ECM (*Mishra et al., 2019; Tseng et al., 2009*). Ο ρόλος του στην ΟΑ δεν είναι απόλυτα σαφής. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του COMP είναι ιδιαίτερα υψηλή στην επιφανειακή στοιβάδα του χόνδρου, ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης του είναι διαφορετικά μεταξύ του πρώιμου και του τελικού σταδίου της ΟΑ λόγω της προσπάθειας του να επιδιορθώσει τις αλλοιώσεις του χόνδρου, συμπεραίνοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα του COMP μπορεί να συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου ή να βελτιώσουν την κατεστραμμένη ECM (*Koelling et al., 2006*). Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την αγγρεκάνη και με τα ινίδια κολλαγόνου και διασπάται από τις ADAMTS-7 και ADAMTS-12. Μεταλλάξεις του έχουν συσχετιστεί με ψευδοαχονδροπλασία, δυσπλασίες και σκελετικές διαταραχές στον άνθρωπο καθώς μπορεί να συσχετιστεί και με την σοβαρότητα της ΟΑ (*Koelling et al., 2006; Li et al., 2022; Tseng et al., 2009*).



Εικόνα 4: Αλληλεπίδραση χαρακτηριστικών γονιδίων της OA και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται (Segarra-Queralt et al., 2023)

1.6. Διάγνωση

Η διάγνωση της οστεοαρθρίτιδας γίνεται σε πρώτη φάση με την αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων. Η επιβεβαίωση της μπορεί να γίνει με απλή ακτινογραφία και πιο σπάνια χρησιμοποιείται μαγνητική και αξονική τομογραφία. Η αξιολόγηση των ευρημάτων της ακτινογραφίας όπως η στένωση του αρθρικού χόνδρου και ο σχηματισμός των οστεοφύτων γίνεται με την χρήση συστημάτων ταξινόμησης. Το πιο κοινό σύστημα ταξινόμησης είναι το Kellgren-Lawrence, με το οποίο τα άτομα με OA ταξινομούνται με βάση τα κλινικά ευρήματα της ακτινογραφίας σε 4 στάδια (KELLGREN & LAWRENCE, 1957). Η μαγνητική τομογραφία παρέχει ακριβέστερες απεικονίσεις της άρθρωσης, των τενόντων και μπορεί να απεικονίσει τυχόν οίδημα στο οστό καθώς και να εντοπίσει προδιαθεσικούς παράγοντες όπως κακώσεις του μηνίσκου και του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου. Τέλος, οι εργαστηριακές εξετάσεις και το ιστορικό χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της νόσου (Abramoff & Caldera, 2020).

1.7.Θεραπεία

Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές μελέτες γύρω από τις κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις της ΟΑ, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία που να συμβάλλει στην αναστροφή του ΟΑ φαινοτύπου ή την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου. Οι διάφορες διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν μόνο στην άμεση ανακούφιση και μείωση του πόνου και της δυσκαμψίας και στη μείωση της φλεγμονής, αφήνοντας ως μόνη διέξοδο σε προχωρημένα στάδια της νόσου τη χειρουργική επέμβαση και συγκεκριμένα την ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου (*S et al., 2018*).

1.7.1. Φαρμακευτική και χειρουργική θεραπεία της ΟΑ

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας είναι ποικίλες και στηρίζονται κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις μη φαρμακολογικές, φαρμακολογικές και χειρουργικές θεραπείες. Στις μη φαρμακολογικές θεραπείες ανήκουν η σωματική άσκηση και η μείωση του Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) σε περίπτωση παχυσαρκίας. Οι φαρμακολογικές θεραπευτικές προσεγγίσεις αφορούν την χορήγηση κυρίως μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ), ακεταμινοφαίνης, αναλγητικών, οπιοειδών και άλλων αντιφλεγμονωδών ουσιών για την μείωση του πόνου και της φλεγμονής, αλλά δεν μπορούν να αποκαταστήσουν τις βλάβες στον αρθρικό χόνδρο. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί και ενδοαρθρική χορήγηση κορτικοστεροειδών και υαλουρονικού οξέος (*Ni et al., 2020*). Οι παραπάνω φαρμακολογικές προσεγγίσεις εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως γαστρεντερικές, νεφρικές και καρδιακές διαταραχές (*Peláez et al., 2021*). Σε περιπτώσεις προχωρημένου σταδίου της νόσου, και ενώ πιο πάνω θεραπευτικές προσεγγίσεις θεωρηθούν αναποτελεσματικές, πραγματοποιείται χειρουργική επέμβαση και συγκεκριμένα ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου με σκοπό της αντικατάσταση της άρθρωσης ή τμήματος της με τεχνητά εμφυτεύματα. Ωστόσο, παρουσιάζει βασικά μειονεκτήματα όπως οι μολύνσεις, η αστάθεια και η περιορισμένη διάρκεια ζωής που έχουν τα τεχνητά εμφυτεύματα (*Wyles et al., 2015, Zhou, Cai and Lin, 2020*). Τα τελευταία χρόνια βρίσκεται σε εξέλιξη η ανάπτυξη νέων φαρμάκων τα οποία δρουν ως αναστολείς σε μεταβολικά μονοπάτια και μονοπάτια φλεγμονής (*Abramoff & Caldera, 2020*) καθώς επίσης, μεγάλη πρόκληση αποτελεί και η κυτταρική θεραπεία.

1.7.2. Κυτταρική θεραπεία

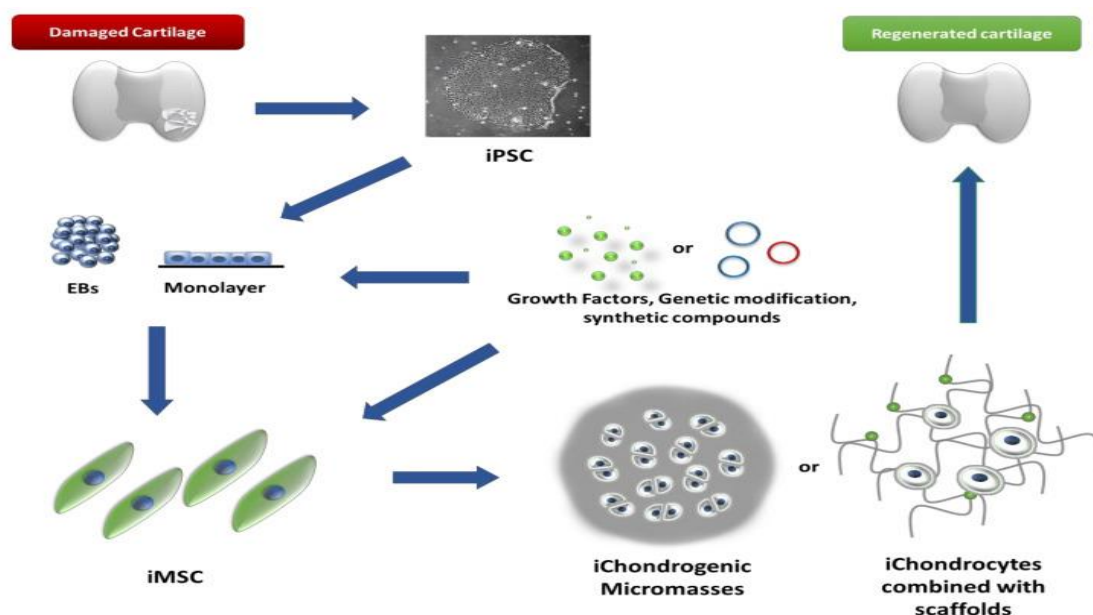
Μέχρι σήμερα, οι διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν ως κύριο στόχο την μείωση και την εξάλειψη των συμπτωμάτων της ΟΑ και όχι την ολική αποκατάσταση της άρθρωσης. Την λύση του προβλήματος προσπάθησε να δώσει η κυτταρική θεραπεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει αρκετές ερευνητικές μελέτες με τη χρήση βλαστικών κυττάρων, τα οποία έχουν ιδιαίτερες αναγεννητικές ικανότητες και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο. Οι βασικοί τύποι των βλαστοκυττάρων που χρησιμοποιούνται στην κυτταρική θεραπεία είναι: τα μεσεγχυματικά ενήλικα βλαστοκύτταρα (MSCs), τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από iPSCs (iMSCs).

Τα MSCs είναι πολυδύναμα κύτταρα και εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του μυελού των οστών, του λιπώδους ιστού και του ομφάλιου λώρου και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς μεσοδερμικής προέλευσης, όπως οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Εμφανίζουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης και παράλληλα εμφανίζουν χαμηλή ανοσογονικότητα (*Ma et al., 2023*). Λόγω των ιδιοτήτων τους έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλές κλινικές δοκιμές στην ΟΑ με υποσχόμενα αποτελέσματα. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το μικροπεριβάλλον του χόνδρου επηρεάζει τις βασικές ιδιότητες των MSCs, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και της παρακρινής τους σηματοδότησης. Επιπλέον, οι πληθυσμοί των MSC είναι εξαιρετικά ετερογενείς, ανάλογα με τον δότη, τον ιστό προέλευσης και τις συνθήκες καλλιέργειας, περιορίζοντας την παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες σε γενετικά σταθερές και αναπαραγωγικές κυτταρικές σειρές (*Konteles et al., 2023; A. K. Zhou et al., 2023*).

Τα iPSCs αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις στο πεδίο των βλαστοκυττάρων και έχουν προταθεί ως ένας υποσχόμενος κυτταρικός πληθυσμός για την αναγέννηση του χόνδρου στην ΟΑ. Διαθέτουν τις ίδιες ιδιότητες με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (ESCs) χωρίς να εμφανίζουν τα ηθικά προβλήματα τους. Προέρχονται από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία υφίστανται μοριακό επαναπρογραμματισμό με εισαγωγή διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (παραγόντες Yamanaka) και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο των τριών βλαστικών στοιβάδων (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Ωστόσο, τα iPSCs εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα που περιορίζουν την χρήση τους

στην κυτταρική θεραπεία. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα iPSCs διατηρούν το επιγενετικό τους προφίλ και την μεταγραφική δραστηριότητα του ιστού – δότη από τον οποίο προήλθαν και εξακολουθεί να υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης όγκων μετά την μεταμόσχευση (*Aldoghachi et al., 2023; Harrell et al., 2019; Konteles et al., 2023; Loo & Wong, 2021*).

Σήμερα, εκμεταλλευόμενοι τις ιδιότητες των iPSCs, έχουν χρησιμοποιηθεί ως κυτταρική πηγή για την δημιουργία επαγόμενων μεσεγχυματικών βαστοκυττάρων, iMSCs, τα οποία μέχρι στιγμής φαίνεται να αποτελούν ιδανική λύση για κυτταρικές θεραπείες (Εικόνα 5). Τα iMSCs είναι ένας ομοιογενής κυτταρικός πληθυσμός, που εμφανίζει παρόμοια φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τα MSCs (υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και μετανάστευσης). Αποτελούν μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ των αρχικών MSCs και των iPSCs με σημαντικές διαφορές στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης τους, αποδεικνύοντας ότι αντιπροσωπεύουν έναν ξεχωριστό κυτταρικό πληθυσμό (*Hua et al., 2022; Konteles et al., 2023*). Παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των MSCs και των iPSCs, καθιστώντας τα ιδανικά για χρήση τους σε κυτταρικές θεραπείες. Αρχικά, σε αντίθεση με τα MSCs, αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή κυττάρων καθώς έχουν την δυνατότητα καλλιέργειας για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να παρουσιάζουν χαρακτηριστικά γήρανσης. Επιπλέον, αντίθετα με τα iPSCs, μετά την μεταμόσχευσή iMSCs δεν έχουν παρατηρηθεί καρκινώματα ή τερατώματα και παρουσιάζουν χαμηλή ανοσογονικότητα. Ακόμη, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται και να διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τα MSCs (*A. K. Zhou et al., 2023*). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρακρινής δράσης τους μέσω της παραγωγής διαφόρων μορίων όπως εξωσώματα και μη κωδικά RNA (ncRNAs), τα οποία μεταφέρουν και μπορούν να μεταβάλλουν τον οστεοαρθρικό φαινότυπο ρυθμίζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην οστεοποίηση, στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και στην προστασία από το οξειδωτικό στρες (*Sabapathy & Kumar, 2016; A. K. Zhou et al., 2023*). Ωστόσο, τα ζητήματα ασφαλείας που προκύπτουν, κυρίως η ανοσοκαταστολή, η αποτελεσματικότητά τους και η επιλογή κατάλληλου κυτταρικού τύπου για την δημιουργία τους δεν έχουν ξεπεραστεί πλήρως αλλά εξακολουθούν να είναι ένα νέο πεδίο για διερεύνηση της θεραπείας της OA (*Lach et al., 2022; A. K. Zhou et al., 2023*).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικής θεραπείας με τη διαφοροποίηση των iPSCs σε iMSCs (Lach et al., 2022)

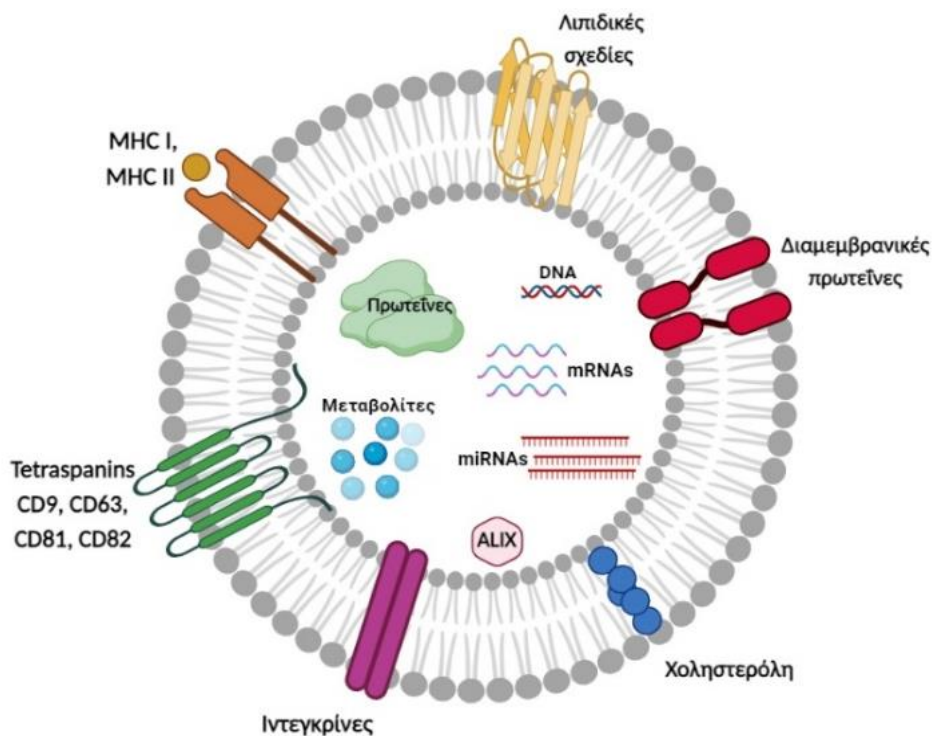
1.8.Εξωσώματα: Διαμεσολαβητές διακυτταρικής επικοινωνίας

1.8.1. Γενικά

Τα εξωσώματα αποτελούν ένα από τους τρεις τύπους εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) μαζί με τα μικροκυστίδια (MVs) και τα αποπτωτικά σωμάτια, τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα (Maas et al., 2017). Ως ένα σημαντικό εξωκυτταρικό κυστίδιο, τα εξωσώματα αποτελούν στόχο μελέτης για αρκετές δεκαετίες (Ni et al., 2020). Ανακαλύφθηκαν το 1993 και αρχικά, θεωρούνταν «οχήματα – μεταφορείς» για την απόρριψη μεταβολικών αποβλήτων από τα κύτταρα αλλά σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν λειτουργικά οχήματα που συμβάλλουν στην διακυτταρική επικοινωνία μεταφέροντας μόρια και γενετικές πληροφορίες μεταξύ των κυττάρων (Valadi et al., 2007; C. Wu et al., 2023).

Χαρακτηριστικά:

Είναι ενδογενή νανοσωμάτια τα οποία περιβάλλονται από φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα με διάμετρο 30–150 nm, πυκνότητα 1.13- 1.19 g/mL (Théry *et al.*, 2006; Y. Zhang *et al.*, 2020) και έχουν την ικανότητα να εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο, να συντήκονται με άλλα κύτταρα και να μεταφέρουν το περιεχόμενό τους σε αυτά. Η σύντηξή τους με άλλα κύτταρα γίνεται είτε μέσω ενδοκυττάρωσης, είτε με σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών τους, είτε με πινοκύτωση. Το περιεχόμενο και το φορτίο που φέρουν είναι σύνθετο και αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια, μεταβολίτες, νουκλεϊκά οξέα (DNA, mRNAs, μη κωδικά RNAs- ncRNAs) (Εικόνα 6) και έτσι, αλληλεπιδρούν με άλλα γειτονικά μόρια συμβάλλοντας στην κυτταρική σηματοδότηση (Fan *et al.*, 2022). Σημαντική μελέτη του 2007 επιβεβαιώνει ότι μόρια mRNA και microRNA μπορούν να «μεταφερθούν» σε άλλα κύτταρα μέσω των εξωσωμάτων, υποδεικνύοντας έτσι, ότι τα εξωσώματα συμβάλλουν στην διακυτταρική επικοινωνία (Valadi *et al.*, 2007).

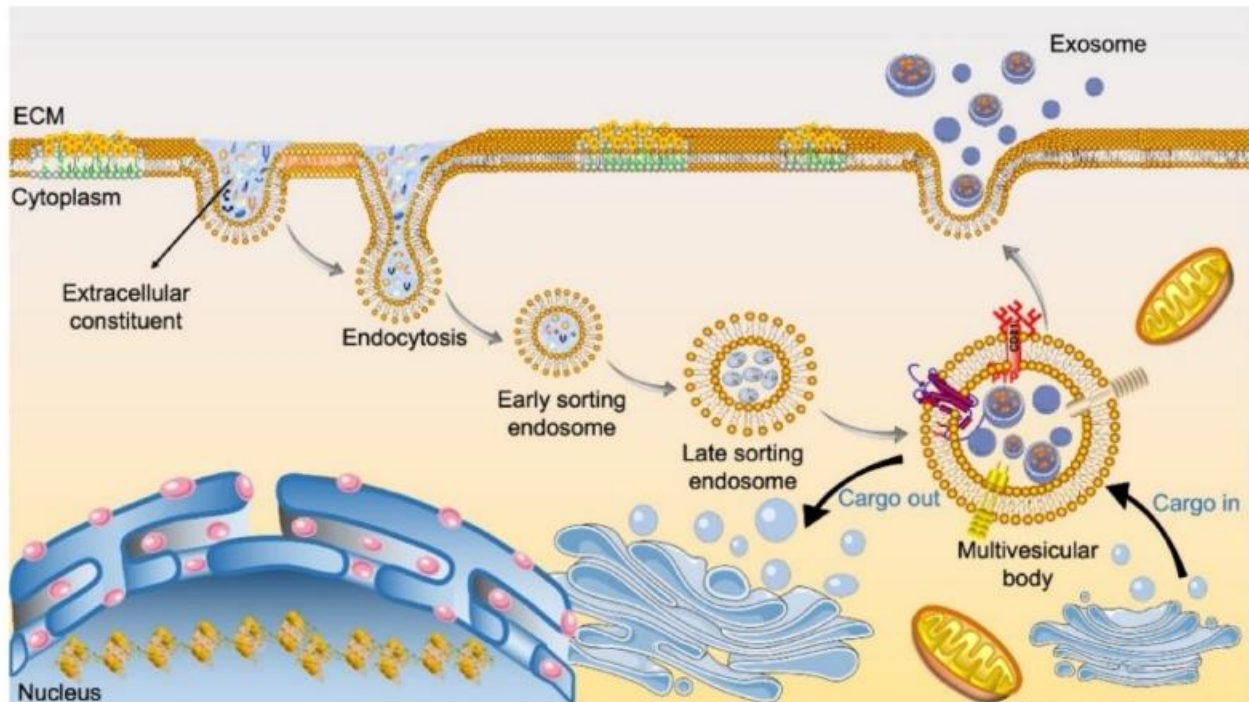


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δομής των εξωσωμάτων (δημιουργήθηκε με την εφαρμογή BioRender.com)

1.8.2. Βιογένεση εξωσωμάτων

Η βιογένεση των εξωσωμάτων μπορεί να χωριστεί στις εξής φάσεις (Ni et al., 2020)(Εικόνα 7):

1. Δημιουργία ενδοκυτταρικών κυστιδίων: εσωτερικές εγκολπώσεις μικροδομών της κυτταρικής μεμβράνης, επικαλυπτόμενες με κλαθρίνη
2. Σχηματισμός πρώιμων ενδοσωμάτων: συγχώνευση ενδοκυτταρικών κυστιδίων
3. Δημιουργία ώσιμων ενδοσωμάτων: ωρίμανση πρώιμων ενδοσωμάτων με απόκτηση φορτίου με τη βοήθεια του ενδοσωμικού συμπλόκου διαλογής – ESCRT
4. Συσσώρευση ώσιμων ενδοσωμάτων και δημιουργία πολυκυστιδικών σωμάτων (MVBs)
5. Τα πολυκυστιδικά σώματα:
 - α) είτε συντήκονται με λυσοσώματα και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση
 - β) είτε συγχωνεύονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και απελευθερώνουν κυστίδια στον εξωκυττάριο χώρο τα οποία ονομάζονται εξωσώματα.

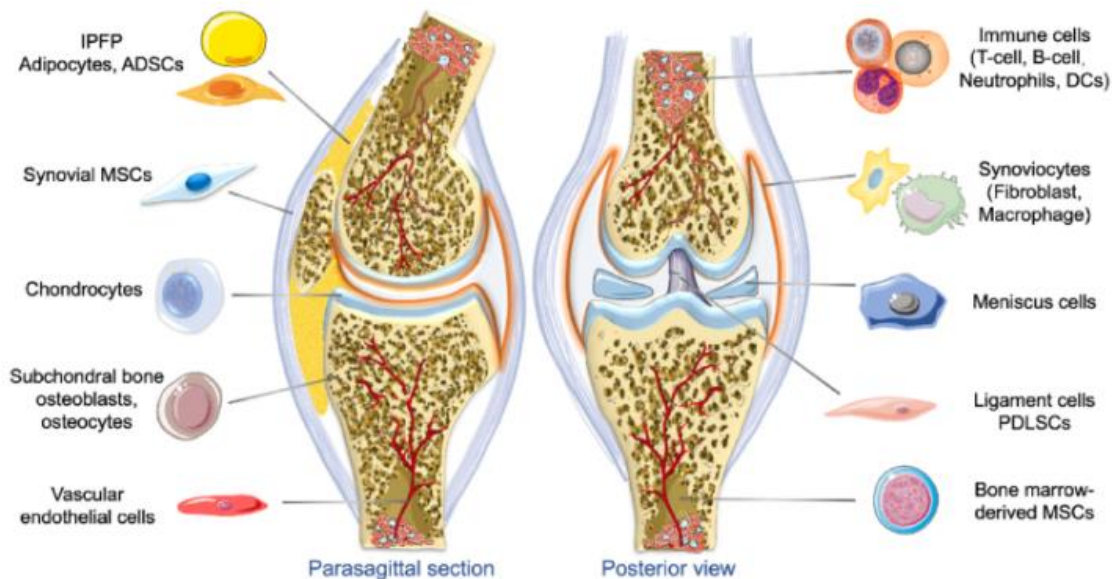


Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση βιογένεσης εξωσωμάτων (Fan, Li and He, 2022)

1.8.3. Ταξινόμηση εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα μπορούν να διαχωριστούν σε φυσικά εξωσώματα και σε μη-φυσικά (modified-engineered) εξωσώματα, αν έχουν υποστεί τροποποίηση (Zhang *et al.*, 2020).

Τα φυσικά ενδογενή εξωσώματα παράγονται και εκκρίνονται από σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους είτε μέσω σύντηξης της κυτταρικής τους μεμβράνης με την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου από το οποίο εκκρίνονται είτε με τη βοήθεια κυτταρικών ενδοσωμικών πολυκυστιδίων (MVBs) (υποενότητα 1.7.2). Στην άρθρωση, τα εξωσώματα παράγονται και εκκρίνονται από σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους που την απαρτίζουν όπως τα χονδροκύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κ.α. (Εικόνα 8) (Fan *et al.*, 2022; Ni *et al.*, 2020).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικών τύπων της άρθρωσης όπου παράγονται και εκκρίνονται εξωσώματα (Fan *et al.*, 2022)

1.8.4. Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα εμφανίζουν ομοιότητες με τους άλλους δύο τύπους εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs), μικροκυστιδία και αποπτωτικά σωμάτια, και έτσι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός τους καθίσταται ιδιαίτερος. Η απομόνωση τους και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να γίνει με διάφορες εργαστηριακές τεχνικές. Οι πιο κοινές τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων είναι η υπερφυγοκέντρωση, τεχνικές που βασίζονται στο μέγεθος των εξωσωμάτων, ανοσοχημικές

μεθόδοι, κατακρήμνιση με πολυαιθυλενογλυκόλες (PEGs) και τεχνικές που βασίζονται στα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Επιπλέον, έχουν δημιουργηθεί διάφορα εμπορικά kit τα οποία βασίζονται στις παραπάνω τεχνικές.

Οι μέθοδοι χαρακτηρισμού των εξωσωμάτων χωρίζονται κυρίως σε δύο τύπους:

- i. Χαρακτηρισμός βάσει των εξωτερικών τους χαρακτηριστικών (μέγεθος, μορφολογία)
- ii. Χαρακτηρισμός βάσει του φορτίου τους (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, λιπιδικές σχεδίες)

Οι κύριες τεχνικές που πραγματοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων είναι με την τεχνική Nanoparticle tracking analysis (NTA), με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot), με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης – SEM, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης – TEM και με κυτταρομετρία ροής. Κάθε μία από αυτές τις τεχνικές παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (*Wu et al., 2019; Fan, Li and He, 2022, Ni et al., 2020, Zhang et al., 2020*). Η λήψη εξωσωμάτων από τον οργανισμό δεν είναι πάντα εύκολη και για αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες για τη σύνθεση εξωκυτταρικών κυστιδίων που εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τα εξωσώματα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα συνθετικά εξωσώματα και engineered εξωσώματα (τροποποιημένα εξωσώματα). Τα τροποποιημένα εξωσώματα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ελκυστικά ως θεραπευτικά φάρμακα, καθώς είναι ικανά να στοχεύουν πολλαπλούς θεραπευτικούς στόχους, παρουσιάζοντας ευνοϊκό προφίλ με χαμηλή ανοσογονικότητα (*Liang et al., 2018*). Επιπλέον, γίνεται διερεύνηση της κατάλληλης εισαγωγής εξωσωμάτων σε εξωγενή μόρια για την μεταφορά φαρμάκων. Κάποιες από τις τεχνικές ενσωμάτωσης είναι η ηλεκτροδιάτρηση, η επιμόλυνση τους με κύτταρα του δότη, η χρήση σαπωνινών, κύκλοι εξώθησης και κύκλοι ψύξης – απόψυξης (*Zhou, Cai and Lin, 2020*).

1.8.5. Ρόλος εξωσωμάτων - Γενικά

Τα εξωσώματα παρουσιάζουν φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες και έχουν θεωρηθεί ισχυροί θεραπευτικοί στόχοι σε πλήθος ασθενειών. Έχει προταθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο στάδιο της διάγνωσης και της θεραπείας μιας ασθένειας (*Ni et al., 2020*). Συγκεκριμένα, στην διάγνωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες καθώς αντικατοπτρίζουν την κατάσταση των κυττάρων από τα οποία παράγονται. Στην θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο χορήγησης φαρμάκων καθώς στοχεύουν σε συγκεκριμένα

κύτταρα και ιστούς, τροποποιώντας τις βιολογικές διαδικασίες των κυττάρων – στόχων τους (Y. Zhang *et al.*, 2020).

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες ερευνητικές μελέτες και έχειδειχθεί ότι ο ρόλος των εξωσωμάτων στην διακυτταρική επικοινωνία είναι πολύ σημαντικός και πολύπλοκος καθώς συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες όπως στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στην κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, στην απόπτωση κ.α. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η επίδραση τους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το φύλο, η παχυσαρκία, η γήρανση και η λήψη φαρμάκων και η επίδραση τους έχει μελετηθεί σε ασθένειες όπως καρκίνος, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα και καρδιαγγειακά νοσήματα (Ni *et al.*, 2020).

Για παράδειγμα, η επίδραση εξωσωμάτων στα καρδιαγγειακά νοσήματα έχει μελετηθεί εκτενώς. Έχειδειχθεί ότι τα εξωσώματα εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα καρδιαγγειακών μοριακών μηχανισμών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών. Παράγοντες όπως το άγχος, η φλεγμονή και η υποξία μπορούν να ρυθμίσουν την έκκριση και το φορτίο τους συμβάλλοντας θετικά ή αρνητικά στην λειτουργία της καρδιάς (Bellin *et al.*, 2019). Επιπλέον, τα εξωσώματα που παράγονται από τα καρδιακά κύτταρα, απελευθερώνονται στα σωματικά υγρά καθιστώντας τα ικανά να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες της πάθησης. Μελέτη των Kuwabara *et al.*, 2011 έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα δύο κύριων miRNAs τα οποία αποτελούν φορτίο εξωσωμάτων και εκφράζονται στην καρδιά, των microRNA-1 (hsa-miR-1) και microRNA-133a (hsa-miR-133a) στον ορό ασθενών που πάσχουν δηλώνουν μυοκαρδιακή δυσλειτουργία και ταυτόχρονα, το microRNA-133a μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την διάγνωση καρδιαγγειακών παθήσεων (Kuwabara *et al.*, 2011). Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μόρια καθώς ρυθμίζουν βιολογικές διεργασίες που οδηγούν σε παθήσεις της καρδιάς (π.χ. έμφραγμα του μυοκαρδίου) καθώς συμβάλλουν στην αναστολή της απόπτωσης, ρυθμίζουν την φλεγμονή, προάγουν την αγγειογένεση και συμβάλλουν στην συνολική διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού (N. He *et al.*, 2020).

1.8.6. Ρόλος των εξωσωμάτων στην ΟΑ

Ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης των εξωσωμάτων στην ΟΑ έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον από τους ερευνητές. Τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου των χονδροκυττάρων, προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας για τη διατήρηση της πυκνότητας των χονδροκυττάρων, η οποία σχετίζεται στενά με την ανανέωση και τον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων (Aldoghachi et al., 2023; C. Wu et al., 2023).

Όπως έχει αναφερθεί, ανάλογα τον κυτταρικό τύπο που εκκρίνονται, έχουν διαφορετικό φορτίο και μπορούν να δράσουν προστατευτικά στη νόσο ή να προάγουν την εξέλιξή της (Q. fa Zhou et al., 2020). Στην οστεοαρθρίτιδα τα εξωσώματα μπορούν να ρυθμίζουν την ομοιόσταση των αρθρώσεων και την επικοινωνία των κυττάρων ή αντίθετα να προάγουν την φλεγμονή και τον εκφυλισμό του χόνδρου (Q. fa Zhou et al., 2020). Χαρακτηριστικά παραδείγματα στην οστεοαρθρίτιδα αποτελούν τα εξωσώματα προερχόμενα από οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα τα οποία συμβάλλουν αρνητικά στην εξέλιξη της, ενώ εξωσώματα που προέρχονται από iMSCs δρουν προστατευτικά της νόσου (Fan, Li and He, 2022). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον των οστών μπορούν να εκκρίνουν εξωσώματα για να ρυθμίσουν την ομοιόσταση του χόνδρου και την οστική απορρόφηση (Ni et al., 2020).

1.8.7. Μη κυτταρική θεραπεία (cell – free therapy) με την χρήση εξωσωμάτων

Οι κυτταρικές θεραπείες αποτελούν ένα εξαιρετικά υποσχόμενο πεδίο για την αντιμετώπιση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης και της ΟΑ. Παρόλα αυτά, η χρήση και η έγχυση βλαστικών κυττάρων ή χονδροκυττάρων εμφανίζουν περιορισμούς ως προς την αποτελεσματικότητα τους τους, με κύριο ζήτημα την ανοσοαπόκριση (υποενότητα 1.6.2.). Έτσι, οι έρευνες στράφηκαν στην ικανότητα των πιο πάνω κυττάρων να παράγουν και να εκκρίνουν εξωσώματα, τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στην αναγέννηση του χόνδρου και στην θεραπεία της ΟΑ, χωρίς να παρουσιάζουν τους περιορισμούς της κυτταρικής θεραπείας (Duan et al., 2021; Sharun et al., 2022). Επιπλέον, οι Peláez et al., 2021 αναφέρουν ότι οι κυτταρικές θεραπείες εμφανίζουν αρκετούς περιορισμούς όπως τα μικρά μεγέθη δειγμάτων, τη βραχυπρόθεσμη και όχι μακροπρόθεσμη μελέτη και την απουσία ομάδων ελέγχου (Peláez et al., 2021).

Αρκετές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με χρήση εξωσωμάτων στην θεραπεία της OA, χωρίς την παρουσία/χρήση κυττάρων. Σε μια *in vitro* μελέτη σε αρουραίους που πραγματοποιήθηκε από τους He et al., 2020, έδειξαν ότι η έγχυση εξωσωμάτων προερχόμενων από μυελό των οστών, κατευθείαν στην άρθρωση, μπορεί να προάγει την αναγέννηση του χόνδρου και την σύνθεση της ECM, μειώνοντας την έκφραση του γονιδίου MMP-13 και αυξάνοντας την έκφραση του κολλαγόνου τύπου II, όπως επίσης, προάγει και τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των χονδροκυττάρων (L. He et al., 2020). Οι Duan et al., 2021, επισημαίνουν ότι η χρήση των εξωσωμάτων αποτελεί μια εξαιρετική προοπτική μη κυτταρικής θεραπείας της OA για την αναγεννητική ιατρική και για την χορήγηση φαρμάκων (Duan et al., 2021).

Τα εξωσώματα παρουσιάζουν μοναδικά χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση της απόδοσής τους ως εξατομικευμένα οχήματα/μέσα για στοχευμένη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών ή φαρμάκων σε κύτταρα και ιστούς (Liang et al., 2018). Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες τροποποίησης των εξωσωμάτων όπως τροποποιήσεις την επιφάνειάς τους και σύντηξή τους με λυσσωσώματα, οι οποίες οδηγούν στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης φαρμάκου, μεγιστοποιώντας τα κλινικά οφέλη των εξωσωμάτων για τη θεραπεία της OA (engineered exosomes) (Duan et al., 2021).

1.8.8. Εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

Τα εξωσώματα που προέρχονται από iMSCs αποτελούν μια εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση μη κυτταρικής θεραπείας για την αντιμετώπιση πιθανών κινδύνων που ενδέχεται να έχουν τα MSCs ή iMSCs κύτταρα σε κλινικές εφαρμογές. Έχουν αναφερθεί θετικά αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο των εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSC σε ασθένειες όπως στην επούλωση δερματικών τραυμάτων και στην οστεοαρθρίτιδα (Aldoghachi et al., 2023).

Οι Kim et al., 2018 σύγκριναν την επίδραση των εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSC με την επίδραση των εξωσωμάτων προερχόμενων από MSC στην επούλωση πληγών στο δέρμα σε πειραματικό μοντέλο αρουραίων. Διαπίστωσαν ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήταν υψηλότερος στα κύτταρα HaCaT (ανθρώπινα κερατινοκύτταρα), που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs σε σύγκριση με τα εξωσώματα προερχόμενα από MSCs, δείχνοντας ότι τα εξωσώματα προερχόμενα από iMSC μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων του δέρματος (Kim et al.,

2018). Ακόμη, μελέτη των Zhu et al., 2017 στην OA, έδειξε ότι η επίδραση εξωσωμάτων προερχόμενα από iMSCs αύξησε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των χονδροκυττάρων συγκριτικά με την επίδραση εξωσωμάτων προερχόμενων από την αρθρική μεμβράνη σε πειραματικό μοντέλο ποντικού, καθιστώντας τα ικανά να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία της OA (Zhu et al., 2017).

Επίσης, τα εξωσώματα προερχόμενα από iMSC έχουν δείξει σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της ασφάλειάς τους, της χαμηλής ανοσογονικότητάς τους και της απουσίας ογκογένεσης. Μπορούν επίσης, να αποτρέψουν ανοσολογικές αντιδράσεις συμπεριλαμβανομένης της απόρριψης θεραπείας μετά την χορήγηση βλαστοκυττάρων σε ασθενείς καθιστώντας τα εξαιρετικό εργαλείο για μη κυτταρικές θεραπείες (cell-free therapies) στην αναγεννητική ιατρική (Aldoghachi et al., 2023).

1.8.9. Περιορισμοί εξωσωμάτων

Η χρήση εξωσωμάτων προερχόμενα από iMSCs στην αναγεννητική ιατρική αποτελεί ένα υποσχόμενο αντικείμενο. Ωστόσο, η χρήση τους στις κλινικές εφαρμογές παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς (Aldoghachi et al., 2023; A. K. Zhou et al., 2023):

- Αναποτελεσματικότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων εξωσωμάτων είτε λόγω υψηλού κόστους είτε λόγω χαμηλής απόδοσης
- Δεν υπάρχει τυποποιημένο πρωτόκολλο για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων. Απαιτείται η ανάπτυξη εξατομικευμένων πρωτοκόλλων
- Η μετατροπή iPSCs σε iMSCs γίνεται με την χρήση διαφόρων μεταγραφικών και επιγενετικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν το φορτίο των εξωσωμάτων
- Πολυπλοκότητα: μετατροπή iPSCs σε iMSCs, δημιουργία κυτταρικής σειράς και έπειτα, παραγωγή εξωσωμάτων, απομόνωση και εισαγωγή τους σε κυτταρική θεραπεία.
- Άγνωστοι οι κυτταρικοί – στόχοι των εξωσωμάτων συγκριτικά με τα βλαστοκύτταρα, τα οποία δρουν στοχευμένα

Εν κατακλείδι, απαιτούνται περισσότερες κλινικές μελέτες για τον ακριβή προσδιορισμό του θεραπευτικού ρόλου των εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSC για την χρήση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις (Aldoghachi et al., 2023).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός εξωσωμάτων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) και η διερεύνηση του ρόλου τους στην οστεοαρθρίτιδα.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες:

- Απομόνωση εξωσωμάτων από iMSCs
- Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών δεικτών CD81 και CD63 που βρίσκονται στην επιφάνεια των εξωσωμάτων μέσω Western Blot, όπου έμμεσα γίνεται η επιβεβαίωση της απομόνωσης τους
- Έμμεση ποσοτικοποίηση των ολικών εξωσωμικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford
- Διερεύνηση πιθανού θεραπευτικού ρόλου των εξωσωμάτων μετά από διαμόλυνση σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (24 ώρες, 48 ώρες και 5 μέρες) και μελέτη της μεταβολής της μεταγραφικής έκφρασης χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών της οστεοαρθρίτιδας και συγκεκριμένα των μεταγραφικών επιπέδων των COL2A1, SOX9, MMP-13, ACAN, ADAMTS-5 και COMP με τη μέθοδο της RT-PCR.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Είδη κυττάρων

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι κυττάρων:

1. Φυσιολογικά χονδροκύτταρα
2. Οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα
3. Μεσεγχυματικά κύτταρα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων

Τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα πάρθηκαν από δείγματα αρθρικού χόνδρου ατόμων που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για σοβαρά κατάγματα ή ακρωτηριασμό, ενώ τα οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα πάρθηκαν από δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών με ΟΑ προχωρημένου σταδίου, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου στην Ορθοπαιδική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα iMSCs προήλθαν από προηγούμενο συνεργατικό πρόγραμμα του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής με τη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία» στην Αθήνα στα πλαίσια προγράμματος ΕΣΠΑ (2018-2023).

3.2. Καλλιέργειες κυττάρων

Συσκευές και μέσα καλλιέργειας κυττάρων:

Οι κυτταροκαλλιέργειες έλαβαν χώρα κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Bluebeam 4, Class II Biohazard Cabinet). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες 25cm³ (CORNING Flask, NY) και 6well plates. Η ανάπτυξη και επώαση των κυττάρων έγινε σε κλίβανο (Heraeus Instruments, Function Line) με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 5% CO₂ και 2% υγρασία και για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Megafuse 1.0R/Heraeus Instruments (για falcons) και Biofyge Fresco/Heraeus Instruments (για eppendorfs). Η κατάψυξη των κυττάρων έγινε σε κρυοφιαλίδιο – cryovial (Cryogenic Vial, CORNING, NY). Τέλος, για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυταροκαλλιέργειες:

- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagles Medium Ham's F-12 With L-Glutamine & 15mM Hepes (DMEM/F-12 1:1 Mix, Lonza, USA)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει DMEM/F-12, FBS και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (αναλογία 90% DMEM/F-12, 10% FBS, 1% P/S)
- Fetal Bovine Serum – FBS (Gibco BRL, UK): εμβρυϊκός βόειος ορός
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X, Gibco BRL, UK): χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των κυττάρων
- DMSO (Sigma Aldrich): χρησιμοποιείται για την προστασία των κυττάρων κατά την διαδικασία της κατάψυξής τους (φωτοευαίσθητο)
- Θρυψίνη (Gibco): ένζυμο για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Δρα στους 37°C και διατηρείται στους 4°C.

3.3. Τεχνικές κυταροκαλλιιεργειών

A) Απόψυξη κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων είναι μια διαδικασία η οποία πρέπει να γίνει γρήγορα έτσι ώστε τα κύτταρα να μην επηρεαστούν από το DMSO, το οποίο σε θερμοκρασία δωματίου είναι κυτταροτοξικό και χρησιμοποιείται για να γίνει η αποθήκευσή τους στους -80°C (διαδικασία κατάψυξης). Κατά την απόψυξη τους, τα χονδροκύτταρα έχουν στρογγυλό σχήμα και είναι ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Για την ανάπτυξή τους χρειάζεται να προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας και να αποκτήσουν πεπλατυσμένο σχήμα.

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της απόψυξης των κυττάρων είναι:

- 1) Προσθήκη 4ml πλήρες θρεπτικού υλικού σε falcon 15ml
- 2) Αφαίρεση του cryovial από την κατάψυξη και τριβή του έτσι ώστε να ξεκολλήσει ο πάγος από τα τοιχώματά του
- 3) Μεταφορά σε falcon 15ml το οποίο περιέχει 4ml πλήρες θρεπτικού υλικού
- 4) Ξέπλυμα του cryovial με θρεπτικό υλικό και μεταφορά του στο ίδιο falcon
- 5) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

- 6) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 6ml PBS
- 7) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 8) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 1ml πλήρες θρεπτικό υλικό
- 9) Μεταφορά κυττάρων στην φλάσκα και ανακίνηση της για να απλωθούν τα κύτταρα ομοιόμορφα
- 10) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο
- 11) Επώαση των κυττάρων στους 37°C (κλίβανο)

B) Ανακαλλιέργεια κυττάρων (Passage/Split)

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν η επιφάνεια της φλάσκας καλύπτεται από κύτταρα σε ποσοστό πάνω από 85-90%. Τα κύτταρα με την παρακάτω διαδικασία διαιρούνται σε δύο νέες φλάσκες.

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της ανακαλλιέργειας κυττάρων είναι:

- 1) Αφαίρεση θρεπτικού από την φλάσκα
- 2) Ξέπλυμα των κυττάρων με 3 ml PBS έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού υλικού, το οποίο επηρεάζει την θρυψινοποίηση λόγω της παρουσίας πρωτεασών που περιέχει το FBS
- 3) Προσθήκη 1ml θρυψίνης
- 4) Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για περίπου 5 λεπτά
- 5) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση της αποκόλλησης των κυττάρων από την φλάσκα
- 6) Προσθήκη 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό για να σταματήσει η θρυψινοποίηση
- 7) Μεταφορά των κυττάρων σε falcon των 15ml και φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 8) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 5ml PBS
- 9) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 10) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- 11) Μοίρασμα σε δύο νέες φλάσκες και προσθήκη επιπλέον πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5ml

- 12) Έλεγχος στο μικροσκόπιο
- 13) Επώαση των κυττάρων στους 37°C (κλίβανο)

Γ) Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η συχνότητα του καθορίζεται από τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της αλλαγής θρεπτικού υλικού είναι:

- 1) Αφαίρεση προϋπάρχοντος θρεπτικού υλικού
- 2) Προσθήκη 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό
- 3) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο
- 4) Επώαση των κυττάρων στους 37°C (κλίβανο)

Δ) Κατάψυξη κυττάρων

Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά με τη χρήση του διαλύματος DMSO, έτσι ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών από τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της κατάψυξης των κυττάρων είναι:

- 1) Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- 2) Ξέπλυμα των κυττάρων με 2ml PBS (x2)
- 3) Προσθήκη 1ml θρυψίνης
- 4) Επώαση στους 37°C (κλίβανο) για 3-4 λεπτά για να δράσει η θρυψίνη
- 5) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση της αποκόλλησης των κυττάρων από την φλάσκα, αφού πρώτα την χτυπάμε σε μια επιφάνεια για να ξεκολλήσουν εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα
- 6) Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού χωρίς να αφαιρεθεί η θρυψίνη
- 7) Μεταφορά σε falcon 15ml
- 8) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 9) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 5ml PBS

- 10) Φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 11) Απόρριψη υπερκειμένου και εναπόθεση του falcon ανάποδα σε διηθητικό χαρτί με προσοχή να μην χαθεί ίζημα
- 12) Επαναδιάλυση του ιζήματος με 2ml μείγματος θρεπτικού υλικού (60% DMEM/F-12, 30% FBS, 10% DMSO) και μεταφορά σε κρυοφιαλίδιο (cryovial)
- 13) Τοποθέτηση του cryovial αρχικά στους -20°C για περίπου 3 ώρες και τέλος, αποθήκευση στους -80°C.

3.4. Απομόνωση εξωσωμάτων από ολικό RNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση εξωσωμάτων από iMSCs με στόχο την μελέτη της επίδρασης τους στα χονδροκύτταρα.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των εξωσωμάτων είναι τα εξής:

- Διάλυμα Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, Lithuania)
- Fetal Bovine Serum – FBS exosome-depleted (Gibco BRL, UK): εμβρυϊκός βόειος ορός χωρίς την παρουσία εξωσωμάτων
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagles Medium Ham's F-12 With L-Glutamine & 15mM Hepes (DMEM/F-12 1:1 Mix, Lonza, USA)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει DMEM/F-12, FBS και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (αναλογία 90% DMEM/F-12, 10% FBS, 1% P/S)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X, Gibco BRL, UK)

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της απομόνωσης των εξωσωμάτων είναι:

- 1) Αρχικά προηγήθηκε απόψυξη και καλλιέργεια iMSCs σε φλάσκα
- 2) Παρασκευή 5ml μείγματος θρεπτικού υλικού με FBS χωρίς εξωσώματα
- 3) Αφαίρεση προυπάρχοντος θρεπτικού υλικού
- 4) Προσθήκη 5ml μείγματος θρεπτικού υλικού με FBS χωρίς εξωσώματα
- 5) Επώαση των κυττάρων για 2-3 μέρες στους 37°C (κλίβανο)
- 6) Μεταφορά του θρεπτικού υλικού που υπάρχει μέσα στην φλάσκα σε falcon
- 7) Φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

- 8) Μεταφορά και διαμερισμός του θρεπτικού υλικού που υπάρχει μέσα στην φλάσκα σε 4 eppendorfs (~1ml/eppendorf) και καταγραφή όγκου
- 9) Προσθήκη διαλύματος Total Exosome Isolation σε αναλογία 1:2 με τον όγκο του πιο πάνω υπερκειμένου (250μl)
- 10) Ανάδευση με vortex
- 11) Επώαση των κυττάρων στους 4°C μέχρι την επόμενη μέρα (overnight)
- 12) Φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 1 ώρα στους 4 °C
- 13) Απόρριψη υπερκειμένου (τα εξωσώματα έχουν σχηματίσει ίζημα)
- 14) Επαναδιάλυση ή επανααιώρηση ιζήματος με PBS έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl
- 15) Αποθήκευση στους -80°C

3.5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης - TEM

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης χρησιμοποιείται για να αποτύπωση διαφόρων βιολογικών μορίων. Βασίζεται στο γεγονός ότι το δείγμα ακτινοβολείται από μια δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος. Έπειτα, με την βοήθεια συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών, ελέγχεται η περιοχή που φωτίζεται καθώς και η εστίαση της δέσμης και τα ηλεκτρόνια οδηγούνται σε μια οθόνη όπου και αποτυπώνεται η εικόνα. Είναι σημαντικό το δείγμα να είναι αρκετά λεπτό έτσι ώστε να διαπεραστεί από τα ηλεκτρόνια. Το βασικό πλεονέκτημα που προσφέρει είναι η ολοκληρωμένη εικόνα των βιολογικών μορίων και οι άμεσες πληροφορίες που μπορούν να δώσουν όπως το μέγεθος, το σχήμα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η μελέτη της μορφολογίας των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στην Αθήνα.

3.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western blot

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι μία τεχνική ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτή με βάση το μοριακό τους βάρος και στην συνέχεια, σε μια δεύτερη ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε μια συνθετική μεμβράνη, όπου οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν επώζοντας την μεμβράνη με ειδικό αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

Η μέθοδος μπορεί να χωριστεί στα εξής στάδια:

- A. Αποδιάταξη πρωτεϊνών
- B. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου
- C. Διαχωρισμός πρωτεϊνών
- D. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Αρχικά, πραγματοποιείται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στην συνέχεια, γίνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακού τους βάρους μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με δύο ηλεκτροφορήσεις. Η πρώτη γίνεται σε πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) όπου οι πρωτεΐνες συρρικνώνονται σε μια μικρή ζώνη και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών κάθε δείγματος, ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η οποία βοηθάει στην αντίδραση των πρωτεϊνών με τα αντισώματα. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη προσδένετε στο πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη και στην συνέχεια, το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζεται από το δευτερογενές. Αυτό πραγματοποιείται μέσω την επώαση των δειγμάτων σε φωτοενισχυτικό και η ένταση του σήματος είναι ανάλογο των επιπέδων έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Τέλος, η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων σε μπάντες γίνεται με αυτοραδιογραφία με τη βοήθεια της συσκευής UVITED Alliance και του ανάλογου λογισμικού προγράμματος. Ως πρωτεΐνη μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη καλνεξίνη.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε Western blot για τον έλεγχο και την ταυτοποίηση ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών CD63 και CD81, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των εξωσωμάτων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιογένεση τους. Με αυτό τον τρόπο γίνεται έμμεσα η επιβεβαίωση της απομόνωσης των εξωσωμάτων.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot):

- 1) Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- 2) Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- 3) Separating gel και Stacking gel (30% acrylamide/0.8% bisacrylamide, 4x Tris-Cl/SDS, dH₂O, 10% ammonium persulfate, TEMED)

- 4) Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Pre-Stained Protein ladder, Thermo Scientific)
- 5) Διάλυμα ηλεκτροφόρησης δις απεσταγμένο νερό - ddH₂O (DEMO S.A.)
- 6) Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer): methanol, wet transfer, dH₂O
- 7) Ponceau
- 8) Διάλυμα πλύσης TBS-T: 900ml dH₂O, 100ml 10x TBS, 1ml Tween
- 9) Διάλυμα αποκλεισμού (blocker): σκόνη γάλακτος, TBS 1x
- 10) Αντισώματα (NovusBio)
- 11) Ενισχυτικά σήματος: Western Lighting Plus-ECL (PerkinElmer), Super Signal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

3.7. Υπολογισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια φασματοσκοπική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στη χρήση χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρωστική έχει αρνητικό φορτίο, στην ελεύθερη της μορφή έχει κόκκινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 460nm. Όταν η χρωστική αλληλεπιδράσει με τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης οδηγεί στον σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος μπλε χρώματος με μέγιστη οπτική απορρόφηση στα 595nm.

Για την εφαρμογή της μεθόδου Bradford απαιτείται ο σχεδιασμός και η χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη της συσχέτισης τιμών απορρόφησης και συγκέντρωσης της πρωτεΐνης/εξωσωμάτων με την βοήθεια δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης αλβουμίνης.

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την έμμεση ποσοτικοποίηση των απομονωμένων εξωσωμάτων, μετρώντας την συγκέντρωση των ολικών εξωσωμικών πρωτεϊνών.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Εταιρεία ThermoFisher Scientific (BCA protein Assay kit 23227)

Η διαδικασία για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι η εξής:

- 1) Δημιουργία συγκεκριμένης συγκέντρωσης δειγμάτων αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) αραιωμένης σε ddH₂O (συγκεντρώσεις 0 μg, 2.25μg, 0.5μg, 0,75μg, 1μg και 1,5μg)
- 2) Προσθήκη 25μl από κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης
- 3) Προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα
- 4) Επώαση μείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Ήπια ανάδευση των δειγμάτων
- 6) Φωτομέτρηση στα 595nm με τη χρήση του Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)
- 7) Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (διάγραμμα OD/συγκέντρωση)

Για τον προσδιορισμό της άγνωστης εξωσωμικής συγκέντρωσης των υπό μελέτη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 5μl διαλύματος εξωσωμάτων από κάθε δείγμα (διαλύματα 5ml, 10ml και 15ml) σε διάλυμα Bradford ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που πάρθηκαν μετά την φωτομέτρηση συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης και έτσι, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των εξωσωμάτων σε κάθε δείγμα.

3.8. Χρώση εξωσωμάτων

Για τον έλεγχο την πρόσληψης εξωσωμάτων από φυσιολογικά χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε χρώση της λιπιδιακής μεμβράνης τους με την χρωστική PKH67. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ικανότητα να προσδένεται στην λιπιδιακή μεμβράνη των εξωσωμάτων και να εκπέμπει πράσινο φθοριόχρωμα στα 490-504nm. Για την επιβεβαίωση της εισόδου τους στα χονδροκύτταρα, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI, η οποία προσδένεται στους πυρήνες και εκπέμπει μπλε φθοριόχρωμα. Για τον έλεγχο της παρατήρηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- PKH67 Green Fluorescent Cell Mini Kit for General Cell Membrane Labeling – MINI67-1KT (SIGMA-ALDRICH, USA)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X, Gibco BRL, UK)
- 10% Φορμαλίνη (Φορμαλδεϋδη)
- Χρωστική DAPI

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της χρώσης εξωσωμάτων περιλαμβάνει:

- 1) Καταγραφή αρχικού όγκου εξωσωμάτων (αν ο όγκος είναι κάτω από 1ml γίνεται προσθήκη διαλύματος Diluent C)
- 2) Προσθήκη 6μl διάλυμα χρωστικής PKH67
- 3) Ανάδευση με πιπέτα για 30 sec και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Παρασκευή μείγματος DMEM-F12, PBS με 2ml BSA 10% (όγκος μέχρι 8.5ml)
- 5) Παρασκευή διαλύματος σουκρόζης 0,971M
- 6) Προσθήκη 1,5 ml διαλύματος σουκρόζης στον πάτο του tube
- 7) Φυγοκέντρηση στις 19000 στροφές για 2 ώρες στους 4°C
- 8) Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος με PBS
- 9) Μεταφορά σε στήλη φίλτρου και προσθήκη 9 ml PBS και 75μl θρεπτικού
- 10) Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 40 λεπτά στους 4°C και επανάληψη μέχρι ο όγκος να μειωθεί σε 0,5-1 ml
- 11) Ανάκτηση εξωσωμάτων από το φίλτρο
- 12) Προσθήκη εξωσωμάτων στις κυτταροκαλλιέργειες για 24 ώρες
- 13) Μονιμοποίηση κυττάρων με 10% φορμαλίνη για 30 λεπτά
- 14) Έπλυση με PBS (3 φορές)
- 15) Χρώση πυρήνων των κυττάρων με χρωστική DAPI
- 16) Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

→ Η χρήση των εξωσωμάτων πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν πιο σύντομα για την εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής έντασης φθορισμού.

3.9. Wound Healing Assay – Scratch Assay

Το Scratch Assay είναι τεχνική μέτρησης της κυτταρικής μετανάστευσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για να αναδειχθεί η ικανότητα των χονδροκυττάρων να προσλαμβάνουν εξωσώματα καθώς και η συμβολή των εξωσωμάτων στην ικανότητα μετανάστευσης των χονδροκυττάρων και κατ' επέκταση στην εφαρμογή τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις της νόσου.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των εξωσωμάτων, τα οποία απομονώθηκαν από iMSCs κύτταρα, σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 6well plate, και για την συγκεκριμένη τεχνική απαιτείται να υπάρχει πληρότητα κυττάρων πάνω από 90% σε κάθε well. Η επίδραση των εξωσωμάτων μελετήθηκε στις 24 ώρες, 48 ώρες και στις 5 μέρες από την έναρξη της επίδρασης με εξωσώματα (treatment) και ακολούθησε σύγκριση με wells χωρίς προσθήκη εξωσωμάτων (NT – no treatment). Η εκτίμηση της κυτταρικής μετανάστευσης έγινε με βάση τον υπολογισμό της διαμέτρου της χάραξης στους διαφορετικούς χρόνους με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

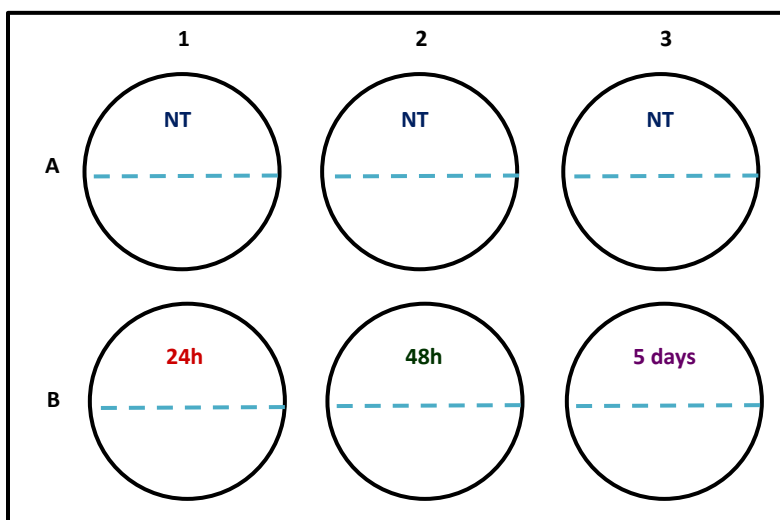
Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagles Medium Ham's F-12 With L-Glutamine & 15mM Hepes (DMEM/F-12 1:1 Mix, Lonza, USA)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X, Gibco BRL, UK): χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των κυττάρων
- Εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

Διαδικασία Wound Healing:

- 1) Παρασκευή μείγματος 6ml θρεπτικού υλικού με 50μl εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs
- 2) Σημείωση χρόνων πάνω σε κάθε well
- 3) Χάραξη στο κέντρο κάθε well με τιπ πιπέτας 100-1000μl
- 4) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο
- 5) Απόρριψη προϋπάρχοντος θρεπτικού υλικού
- 6) Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS (2 φορές)

- 7) Προσθήκη 2ml μείγματος θρεπτικού – εξωσωμάτων στα wells που έχουν σημειωθεί οι χρόνοι θεραπείας και στα υπόλοιπα wells γίνεται προσθήκη 2ml απλού θρεπτικού υλικού
- 8) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών
- 9) Μετά από 24 ώρες, γίνεται ο έλεγχος των 24h well στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών.
- 10) Ακολούθησε το ίδιο στις 48 ώρες



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της χάραξης των κυτταρικών πληθυσμών στο 6 well plate, στις διαφορετικές χρονικές συνθήκες επίδρασης με εξωσώματα

3.10. Επίδραση εξωσωμάτων προερχόμενα από iMSCs (treatment) σε OA χονδροκύτταρα

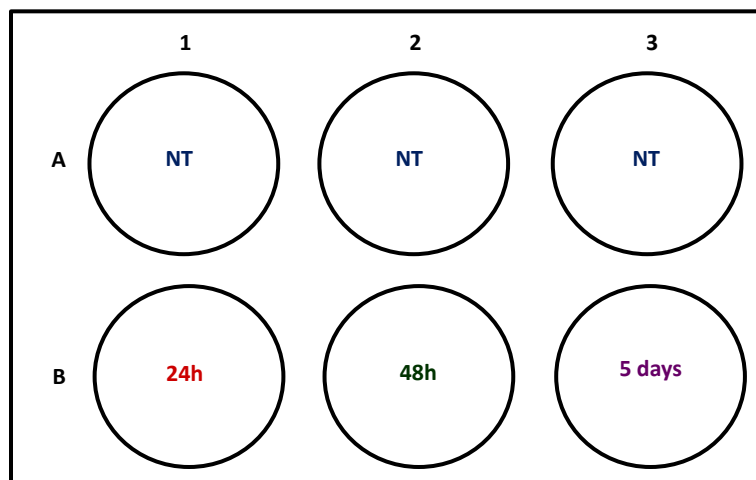
Οι κυτταροκαλλιέργειες αρχικά πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες και στην συνέχεια, έγινε ανακαλλιέργεια σε 6well plate όπου σημειώθηκαν ο χρόνοι επώασης των εξωσωμάτων, 24 ώρες, 48 ώρες και 5 μέρες και συγκρίθηκαν με wells χωρίς την προσθήκη εξωσωμάτων (NT).

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagles Medium Ham's F-12 With L-Glutamine & 15mM Hepes (DMEM/F-12 1:1 Mix, Lonza, USA)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X, Gibco BRL, UK): χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των κυττάρων
- Εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

Διαδικασία για την μελέτη της επίδρασης των εξωσωμάτων από iMCS σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα:

- 1) Παρασκευή μείγματος 6ml θρεπτικού υλικού με 50μl εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs
- 2) Απόρριψη προϋπάρχοντος θρεπτικού υλικού
- 3) Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS (2 φορές)
- 4) Προσθήκη 2ml μείγματος θρεπτικού – εξωσωμάτων στα wells που έχουν σημειωθεί οι χρόνοι
- 5) Προσθήκη 2ml απλού θρεπτικού στα wells χωρίς εξωσώματα (NT)
- 6) Μετά από 24 ώρες ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA (προσθήκη TRIzol) στο 24h well, η οποία περιγράφεται αναλυτικά αμέσως μετά
- 7) Το ίδιο ακολούθησε και για τους χρόνους θεραπείας 48 ώρες, 5 μέρες αλλά και για NT
- 8) Ακολούθησαν οι διαδικασίες σύνθεσης cDNA και RT-PCR, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά πιο κάτω



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικών πληθυσμών στο 6 well plate, στις διαφορετικές χρονικές συνθήκες θεραπείας με εξωσώματα

3.10.1. Απομόνωση ολικού RNA από οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

Στην συνέχεια, μετά την καλλιέργεια των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με εξωσώματα ήταν η απομόνωση του ολικού RNA από οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, με σκοπό να μελετηθούν οι χαρακτηριστικοί μοριακοί δείκτες της ΟΑ.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- TRIzol Reagent (ambion by Life Technologies): χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων, διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA λόγω αναστολής της δράσης RNAσών
- Χλωροφόρμιο (Merck): χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των κυτταρικών συστατικών σε φάσεις
- Ισοπρυλική αλκοόλη (Amersco): χρησιμοποιείται για την κατακρίμνηση του RNA
- Αιθανόλη 75% (Scharlau): χρησιμοποιείται για εκπλύσεις του RNA
- RNase – Free water (Invitrogen): χρησιμοποιείται για την επαναδιάλυση του RNA

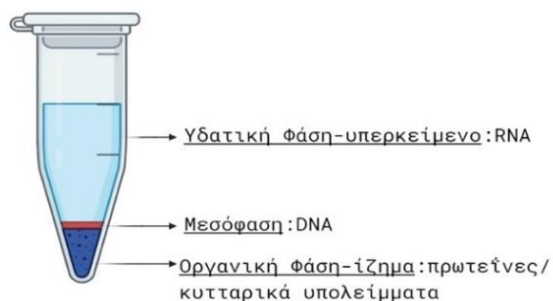
Αναλυτικά το πρωτόκολλο της απομόνωσης ολικού RNA περιλαμβάνει:

Ομογενοποίηση κυττάρων

- 1) Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και προσθήκη 0,5ml TRIzol
- 2) Μεταφορά σε eppendorf των 2ml, ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C

Διαχωρισμός φάσεων

- 3) Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιο για κάθε ml TRIzol και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
- 4) Επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- 6) Μεταφορά του υπερκείμενου – της ανώτερης υδατικής φάσης σε νέο eppendorf



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των 3 στοιβάδων/φάσεων που σχηματίζονται (δημιουργήθηκε με την εφαρμογή BioRender)

Κατακρήμνιση RNA

- 7) Προσθήκη 0,5ml ισοπρυλική αλκοόλη για κάθε ml TRIzol
- 8) Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 9) Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C

Έκπλυση RNA

- 10) Αφαίρεση υπερκειμένου, ξέπλυμα του ιζήματος με 1ml αιθανόλη 75% και ανάδευση
- 11) Φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- 12) Αφαίρεση υπερκειμένου και στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου (κλίβανο)

Επαναδιάλυση RNA

- 13) Προσθήκη 30μl RNase – Free water και επαναδιάλυση ιζήματος
- 14) Επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C (υδατόλουτρο)
- 15) Ανάδευση και αποθήκευση στους -80 °C

→ Για την επιβεβαίωση της απομόνωσης RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση με τη χρήση του Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

Thermo Fisher Scientific (Qubit™ RNA Broad Range (BR), Q10211)

Αναλυτικότερα η διαδικασία της φωτομέτρησης περιλαμβάνει:

- 1) Παρασκευή μείγματος (working solution) με 1μl Reagent (χρωστική) και 119μl Buffer (αναλογία 1:200) για κάθε δείγμα σε τελικό όγκο 2ml
- 2) Προσθήκη από 196μl μείγματος σε κάθε eppendorf
- 3) Προσθήκη 4μl κάθε δείγματος στο αντίστοιχο eppendorf
- 4) Ανάδευση για 5 sec
- 5) Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 6) Φωτομέτρηση RNA στα 260-280nm

3.10.2. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA – cDNA

Σε συνέχεια της απομόνωσης του RNA ακολούθησε η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Στη συγκεκριμένη μέθοδο η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μία αλυσίδα RNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) με τη χρήση μίγματος τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών (random primers), οι οποίοι προσδένονται σε τυχαίες θέσεις στο μόριο RNA.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Random primers (Takara Bio)
- 5x first Strand Buffer (Invitrogen)
- 0.1M DTT (Invitrogen)
- M-MLV – Reverse Transcriptase (200U/μl) (Invitrogen)
- dNTPs (Thermo Fisher Scientific)
- Δις απεσταγμένο νερό – ddH₂O (Water, nuclease-free Thermo Fisher Scientific)

Αναλυτικά το πρωτόκολλο της σύνθεσης cDNA περιλαμβάνει 2 στάδια:

1^η Αντίδραση:

- i. Παρασκευή μείγματος για κάθε αντίδραση (για κάθε δείγμα):

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια και αντίστοιχοι όγκοι τους στη 1^η αντίδραση cDNA

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
Random primers	1
dNTPs	1
ddH ₂ O	8
RNA	5

- ii. Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή για θέρμανση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά

2^η Αντίδραση:

- i. Παρασκευή μείγματος για κάθε αντίδραση (για κάθε δείγμα) και προσθήκη στο παραπάνω μείγμα:

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και αντίστοιχοι όγκοι τους στη 2^η αντίδραση cDNA

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
5x first Buffer	4
DTT	2
M-MLV	0.5

- ii. Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή για την διεκπεραίωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τις παρακάτω συνθήκες:

Πίνακας 3: Συνθήκες προγράμματος PCR του θερμοκυκλοποιητή

<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
37°C	2 λεπτά
25°C	10 λεπτά
37°C	50 λεπτά
70°C	15 λεπτά

- iii. Τέλος, αραίωση των cDNA δειγμάτων με προσθήκη 25μl dH₂O.

3.10.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της σύνθεσης συμπληρωματικού DNA πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς GAPDH, το οποίο εκφράζεται σταθερά σε όλους τους ιστούς και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του cDNA σε πηκτη αγαρόζης 3% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Εικόνα 12).

A. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR:

- Buffer Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific)
- Forward primer 5μM (GAPDH)

- Reverse primer 5μM (GAPDH)
- Δις απεσταγμένο νερό – ddH₂O (Water, nuclease-free Thermo Fisher Scientific)

i) Παρασκευή μείγματος για κάθε αντίδραση (για κάθε δείγμα):

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια και αντίστοιχοι όγκοι τους

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
Buffer Dream Taq	12.5
Forward primer 5μM	1
Reverse primer 5μM	1
dH ₂ O	7.5
cDNA	3

ii) Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή για 40 κύκλους με τις παρακάτω συνθήκες:

Πίνακας 5: Συνθήκες προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή

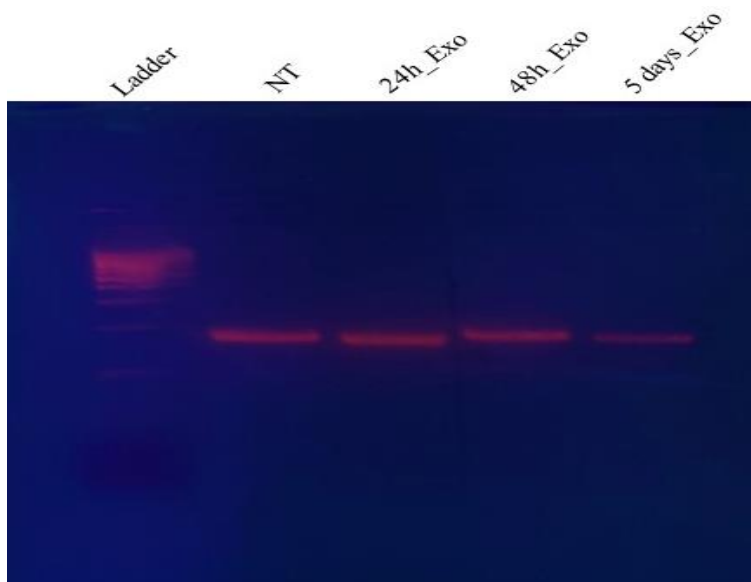
		<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
Στάδιο 1		95°C	1:30 min
Στάδιο 2	Αποδιάταξη DNA	95°C	30 sec
	Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	30 sec
	Επιμήκυνση	72°C	1 min
Στάδιο 3		72 °C	7 min

B. Υλικά για την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης:

- UltraPure Agarose (Invitrogen, Spain)
- UltraPure 10x TBE Buffer (1.0M Tris, 0.9M Boric Acid, 0.01M EDTA, Invitrogen)
- Ethidium Bromide 10mg/ml (Thermo Fisher Scientific)
- Gel Loading Dye Purple 6x (BioLabs)
- DNA Ladder (50bp – no dye, GeneON)

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης (gel):

- 1) Ζύγισμα 4,5gr αγαρόζης
- 2) Μεταφορά της σε κωνική φιάλη η οποία έχει 145,5ml Buffer 1x TBE Buffer (αραίωση από το 10x)
- 3) Ανάδευση και τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
- 4) Προσθήκη 10ml βρωμιούχο αιθίδιο και ανάδευση
- 5) Μεταφορά του στο καλούπι μέχρι να πήξει
- 6) Αφαίρεση του από το καλούπι και τοποθέτηση του στην συσκευή ηλεκτροφόρησης
- 7) Ανάμιξη 10μl χρωστικής με 2μl ladder και φόρτωμα στο gel
- 8) Φόρτωση 15μl από κάθε δείγμα
- 9) Παρατήρηση μέχρι να «τρέξουν» τα δείγματα (περίπου 20 λεπτά)
- 10) Εμφάνιση gel σε UV



Εικόνα 12: Απεικόνιση πηκτής αγαρόζης της ηλεκτροφόρησης cDNA δειγμάτων OA στους διαφορετικούς χρόνους επώασης με εξωσώματα (NT, 24h, 48h και 5days)

3.10.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ονομάζεται και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) και είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον γρήγορο και ακριβή πολλαπλασιασμό και ποσοτικοποίηση ενός τμήματος DNA. Το βασικό πλεονέκτημα

αυτής της τεχνικής και η διαφορά της με την συμβατική PCR είναι ότι δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR, δηλαδή της ενίσχυσης του τμήματος DNA και την παροχή πληροφοριών σε όλη την διάρκεια εξέλιξής της, σε πραγματικό χρόνο.

Γενικά, η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει συνήθως 30-50 επαναλαμβανόμενους κύκλους, ο καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει 3 στάδια όπου στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, σε θερμοκρασία 94-95°C
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA, σε θερμοκρασία ανάλογης της σύνθεσης των εκκινητών
3. Έναρξη της αντιγραφής του DNA-στόχου με τη χρήση DNA πολυμεράσης, σε θερμοκρασία 68-72°C (επιμήκυνση των εκκινητών)

Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών ουσιών και στην ανίχνευση τους κατά την ενσωμάτωσή τους στο τμήμα DNA. Η πιο ευρέα χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική είναι η SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο μόριο DNA, έχει μέγιστη απορρόφηση στα 497nm και αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου καθώς προσδένεται σε όλα τα δίκλωνα μόρια αλλά σε μία μόνο συγκεκριμένη περιοχή τους κάθε φορά. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα λόγω απουσίας δίκλωνων μορίων DNA. Έπειτα, στο στάδιο επιμήκυνσης παρατηρείται η μέγιστη ανίχνευση της χρωστικής καθώς αυξανόμενα μόρια χρωστικής προσδένονται στο νεοσχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την αύξηση της ανίχνευσης του φθορίζοντος σήματος. Η ένταση του φθορίζοντος σήματος μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης. Επομένως, στο τέλος κάθε σταδίου επιμήκυνσης καταγράφεται η ανίχνευση του σήματος και κατά συνέπεια καταγράφεται το αυξανόμενο ποσό του DNA.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η μεταβολή της μεταγραφικής έκφρασης των COL2A1, MMP-13, ACAN, ADAMTS-5, SOX9 και COMP χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς (εσωτερικός μάρτυρας) το *GAPDH*, μετά την επίδραση εξωσωμάτων. Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και το αντίστοιχο πακέτο λογισμικού για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, 7300 System SDS Software.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την RT – PCR:

- Xpert Fast SYBR Mastermix (Uni) (5x1ml) (grisip): 100X ROX (50uM) και Xpert Fast SYBR 2X Mastermix (Uni)
- Εκκινητές γονιδίων (σε συγκέντρωση 5μM) *COL2A1*, *MMP-13*, *ACAN*, *ADAMTS-5*, *SOX9*, *COMP* και *GAPDH*
- Δις απεσταγμένο νερό – ddH₂O (Water, nuclease-free Thermo Scientific Lithuania)

→ Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος της SYBR προστέθηκαν 20 μl χρωστικής στο διάλυμα ROX και ανάδευση.

Διαδικασία RT – PCR για κάθε γονίδιο:

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και αντίστοιχοι όγκοι τους της RT-PCR

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
SYBR Green	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
ddH ₂ O	2
cDNA	3

Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος (για 40 κύκλους):

Πίνακας 7: Συνθήκες προγράμματος της RT-PCR

		<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
Στάδιο 1		95°C	1 min
Στάδιο 2	Αποδιάταξη DNA:	95°C	15 sec
	Υβριδοποίηση εκκινητών/ επιμήκυνση:	60°C	1 min
Στάδιο 3	Dissociation Stage	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min
		95 °C	15 sec
		60 °C	15 sec

Πίνακας 8: Αλληλουχίες εκκινητών των γονιδίων που μελετήθηκαν με RT-PCR

	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	
ΓΟΝΙΔΙΟ	FORWARD	REVERSE
<i>GAPDH</i>	5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT -3'	5'- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG -3'
<i>COLL2A1</i>	5'- ATGACAATCTGGCTCCCAACACTGC -3'	5'- GACCGGCCCTATGTCCACACCGAAT-3'
<i>MMP-13</i>	5'- TGGCATTGCTGACATCATGA -3'	5'- GCCAGAGGGCCCATCAA -3'
<i>ACAN</i>	5'- TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC -3'	5'- GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA -3'
<i>SOX9</i>	5'- TACGACTACACCGACCAC-3'	5'- TCAACGTCGAGTGAGCTGTC-3'
<i>ADAMTS-5</i>	5'- CAGCAGTGCAACCTGACATT -3'	5'- CAGATTCTCCCCTTTCCACA -3'
<i>COMP</i>	5'-CAA CTG TCCCCA GAA GAG CAA-3'	5'-TGG TAG CCA AAG ATG AAG CCC-3'

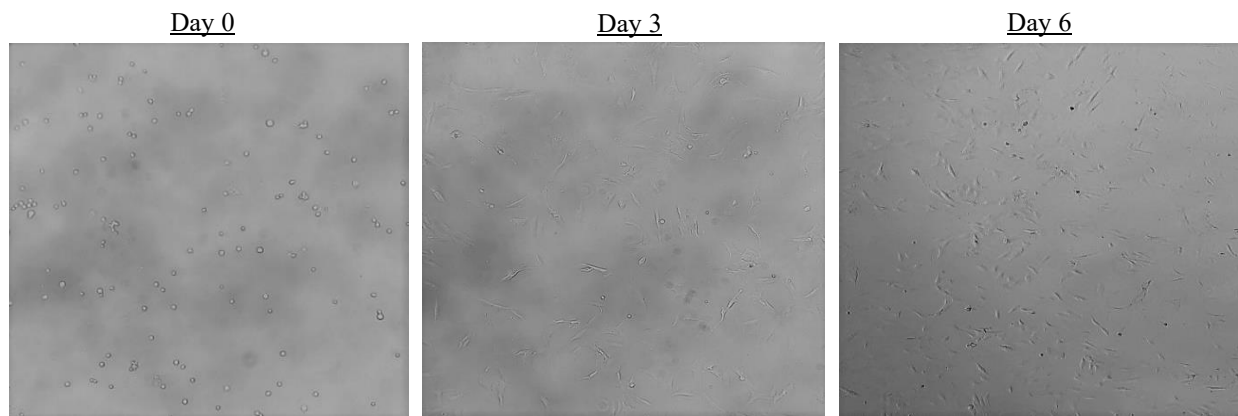
3.11.Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS Statistics έκδοσης 29. Αρχικά, έγινε έλεγχος κανονικότητας των δειγμάτων και στην συνέχεια, ελέγχθηκε αν η επίδραση των εξωσωμάτων επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, με τη βοήθεια του παραμετρικού ελέγχου Repeated Measures ANOVA. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή 0,05 (p-value<0,05).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων

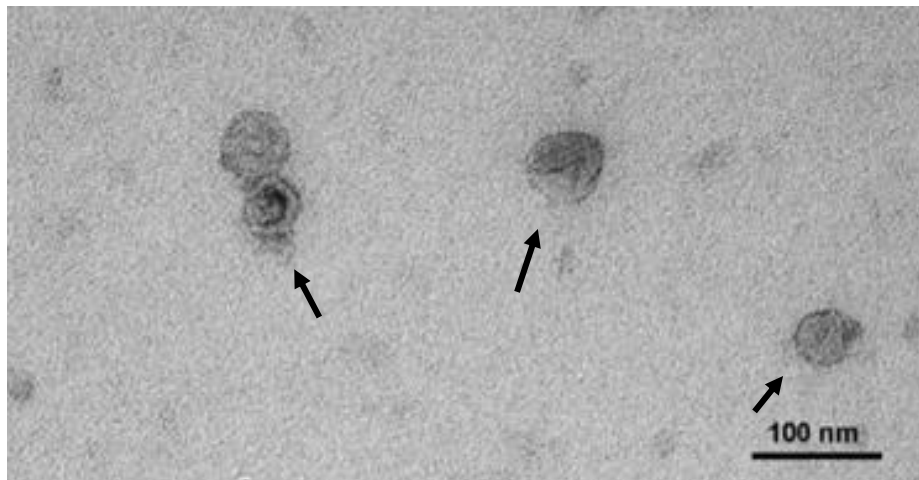
Η καλλιέργεια των φυσιολογικών και οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων καθώς και των επαγόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων (iMSCs) αποτέλεσε το πρώτο βήμα των πειραματικών διαδικασιών. Η παρατήρηση της ανάπτυξης και των διαφόρων μορφολογικών τους αλλαγών γινόταν με την χρήση του ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου. Στην Εικόνα 13 απεικονίζεται η καλλιέργεια οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων αμέσως μετά από ανακαλλιέργεια τους σε νέα φλάσκα (passage) όπου παρατηρείται το στρογγυλό σχήμα που έχουν αρχικά πριν προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας (Day 0), 3 μέρες μετά την επώαση τους στον κλίβανο και την προσκόλληση τους στην φλάσκα όπου τα κύτταρα παίρνουν πεπλατυσμένο σχήμα (Day 3) και 6 μέρες μετά όπου παρατηρείται η αύξηση του αριθμού των κυττάρων (Day 6).



Εικόνα 13: Απεικόνιση οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων αμέσως μετά την ανακαλλιέργεια τους (Day 0), 3 μέρες μετά (Day 3) και 6 μέρες μετά (Day 6) την επώαση τους στον κλίβανο

4.2. Έλεγχος μορφολογίας εξωσωμάτων – TEM

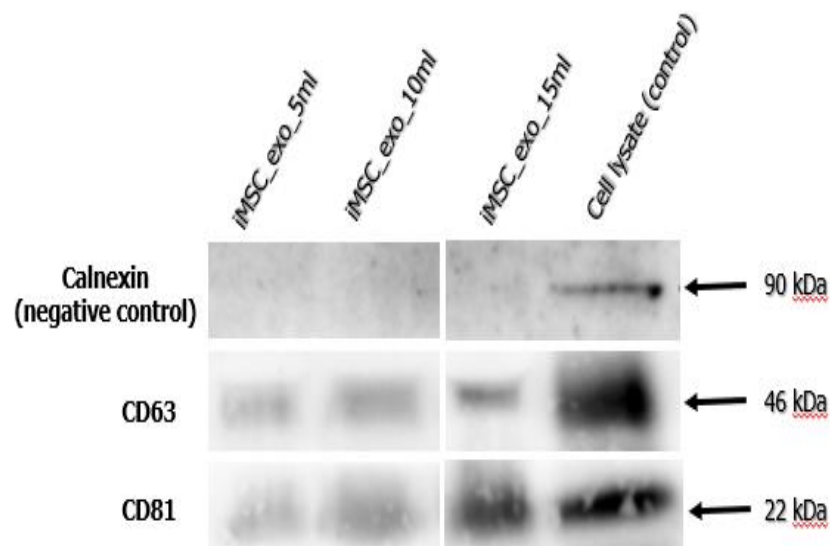
Η μελέτη του σχήματος και του μεγέθους των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης και η απεικόνιση των εξωσωμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Αποτύπωση εξωσωμάτων από iMSCs με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης – (TEM)

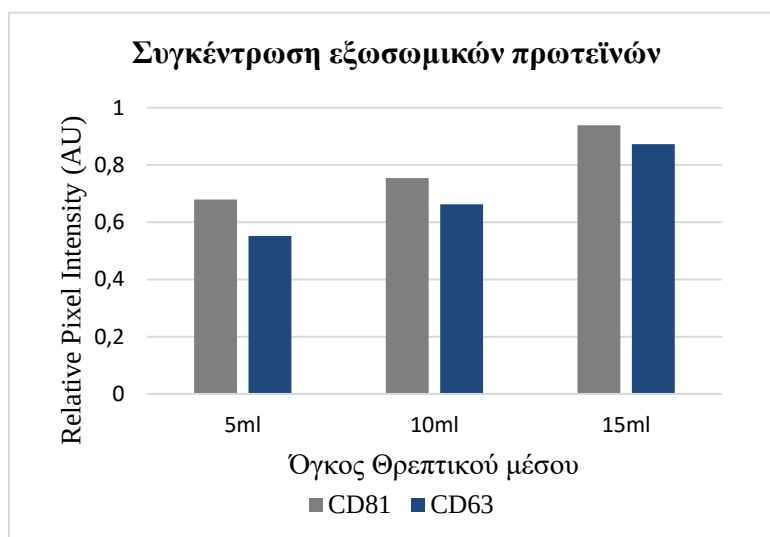
4.3. Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων – μελέτη έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών

Η επιβεβαίωση της απομόνωσης των εξωσωμάτων από iMSCs καθώς και ο χαρακτηρισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Τα εξωσώματα φέρουν στην επιφάνεια τους χαρακτηριστικούς πρωτεϊνικούς δείκτες, όπως CD63 και CD81, των οποίων μελετήθηκε η παρουσία τους σε διαφορετικούς όγκους καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού (5ml, 10ml, 15ml) (Εικόνα 15). Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης των εξωσωμάτων, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η πρωτεΐνη καλνεξίνη, ως αρνητικός μάρτυρας, η οποία είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλλει στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (*Paskevicius et al., 2023*), ενώ απουσιάζει από τα εξωσώματα. Ως control χρησιμοποιήθηκε ολικό κυτταρικό RNA.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών δεικτών CD63 και CD81 στους διαφορετικούς όγκους καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού

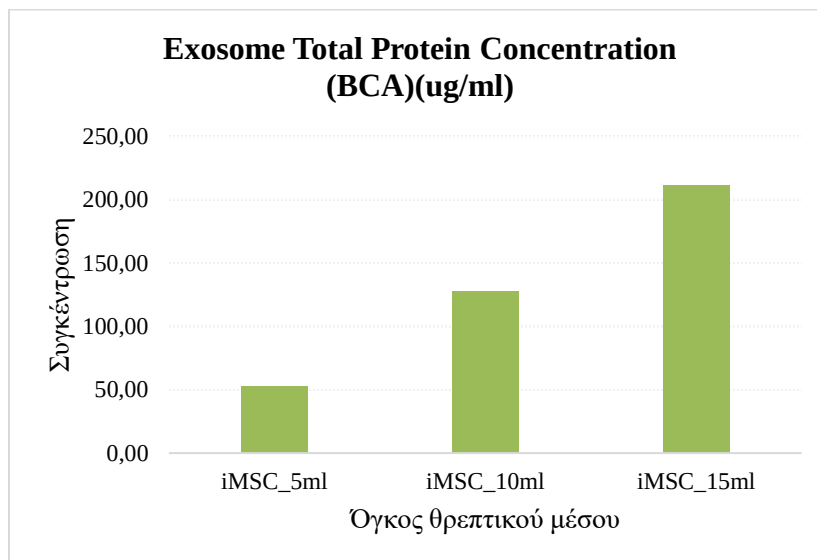
Επιπλέον, με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών δεικτών συγκριτικά με το ολικό κυτταρικό RNA (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των εξωσωμικών πρωτεϊνικών δεικτών CD63 και CD81 στους διαφορετικούς όγκους καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού

4.4. Ποσοτικοποίηση εξωσωμάτων

Η έμμεση ποσοτικοποίηση των ολικών εξωσωμικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bradford (BCA Protein Assay) σε διαφορετικούς όγκους καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού (5ml, 10ml, 15ml) και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των εξωσωμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 17.

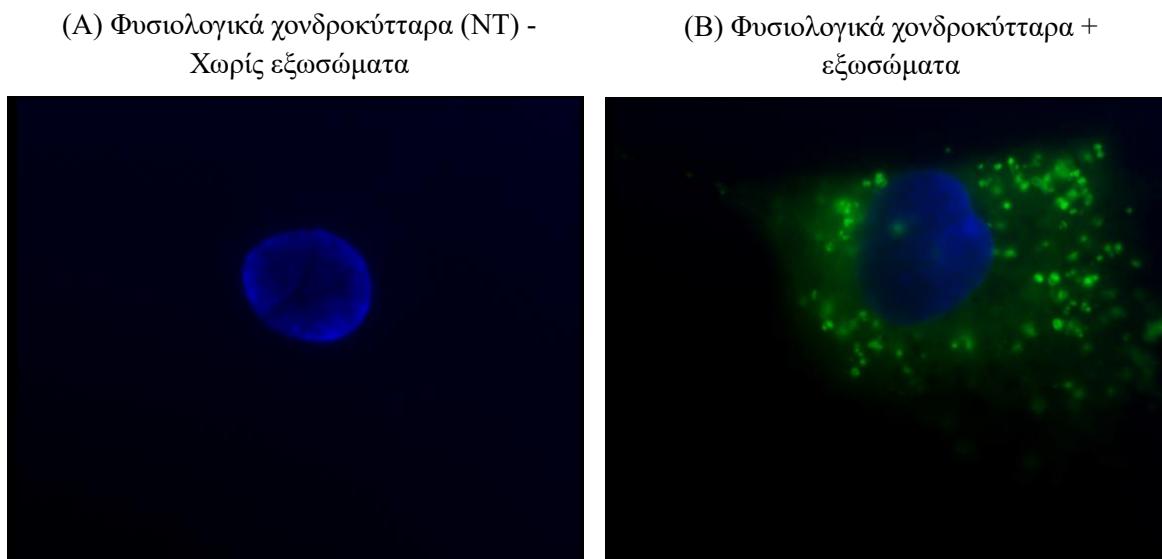


Εικόνα 17: Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των ολικών εξωσωμικών πρωτεϊνών σε διαφορετικούς όγκους καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού (5ml, 10ml και 15ml)

4.5. Πρόσληψη εξωσωμάτων σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Προκειμένου να διερευνηθεί η πρόσληψη των εξωσωμάτων σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε χρώση αυτών με την χρωστική PKH67. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ικανότητα να προσδένεται στην λιπιδιακή μεμβράνη των εξωσωμάτων και να την χρωματίζει (πράσινο χρώμα), ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI για τον χρωματισμό των πυρήνων των κυττάρων (μπλε χρώμα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι φυσιολογικά χονδροκύτταρα που δεν επώαστηκαν με εξωσώματα (NT) παρουσιάζουν χρώση μόνο του πυρήνα με μπλε χρώμα και απουσία πράσινου φθορισμού (Εικόνα 18Α). Αντίθετα, παρουσία πράσινου φθορισμού παρατηρήθηκε σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα τα οποία επώαστηκαν με εξωσώματα για 24 ώρες (Εικόνα 18Β).

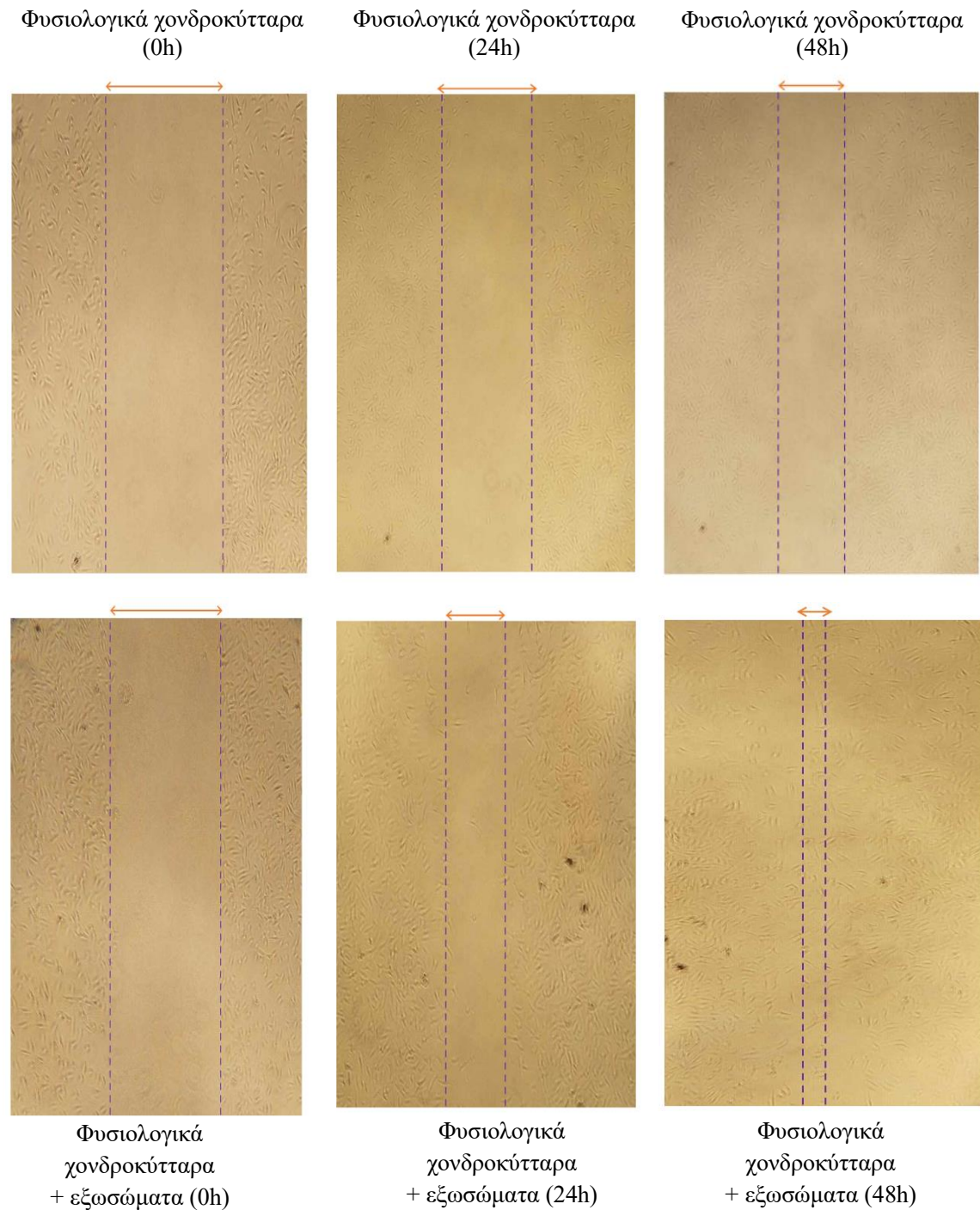
Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πράσινο χρώμα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα υποδηλώνοντας την παρουσία εξωσωμάτων στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών χονδροκυττάρων, επιβεβαιώνοντας την είσοδο τους μέσα στα κύτταρα.



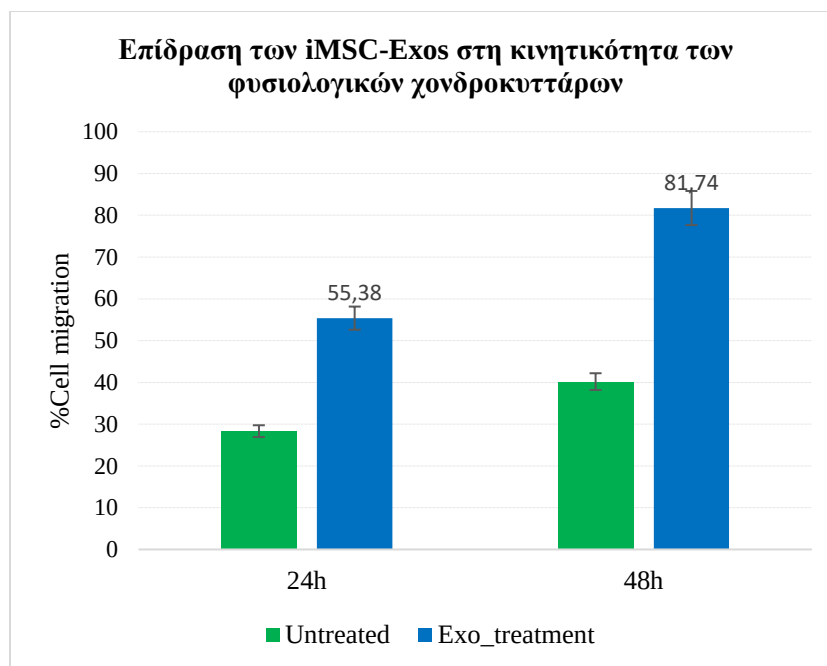
Εικόνα 18: Χρώση εξωσωμάτων σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα (A) απουσία εξωσωμάτων. (B) παρουσία εξωσωμάτων όπου με μπλε (χρωστική DAPI) απεικονίζεται ο πυρήνας του κυττάρου και με πράσινο τα εξωσώματα

4.6. Wound Healing Assay – Scratch Assay

Η τεχνική Scratch Assay μελετήθηκε σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα τα οποία επώαστηκαν με εξωσώματα από iMSCs σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, 24 και 48 ώρες. Η επίδραση των εξωσωμάτων φαίνεται στην Εικόνα 19, όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της διαμέτρου της χάραξης/πληγής που προηγήθηκε, στις 24 ώρες και στις 48 ώρες, συνεπάγοντας την αυξημένη κυτταρική μετανάστευση των χονδροκυττάρων. Στο γράφημα της Εικόνας 20 παρουσιάζεται η αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης (εκφρασμένη σε ποσοστά) στις 24h και 48h μετά την επίδραση των εξωσωμάτων στα χονδροκύτταρα συγκριτικά με τις καλλιέργειες κυττάρων χωρίς την επίδραση εξωσωμάτων.



Εικόνα 19: Απεικόνιση διαμέτρους της πληγής χωρίς την επίδραση εξωσωμάτων και μετά την επίδραση εξωσωμάτων από iMSCs σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα, στις 24h και 48h



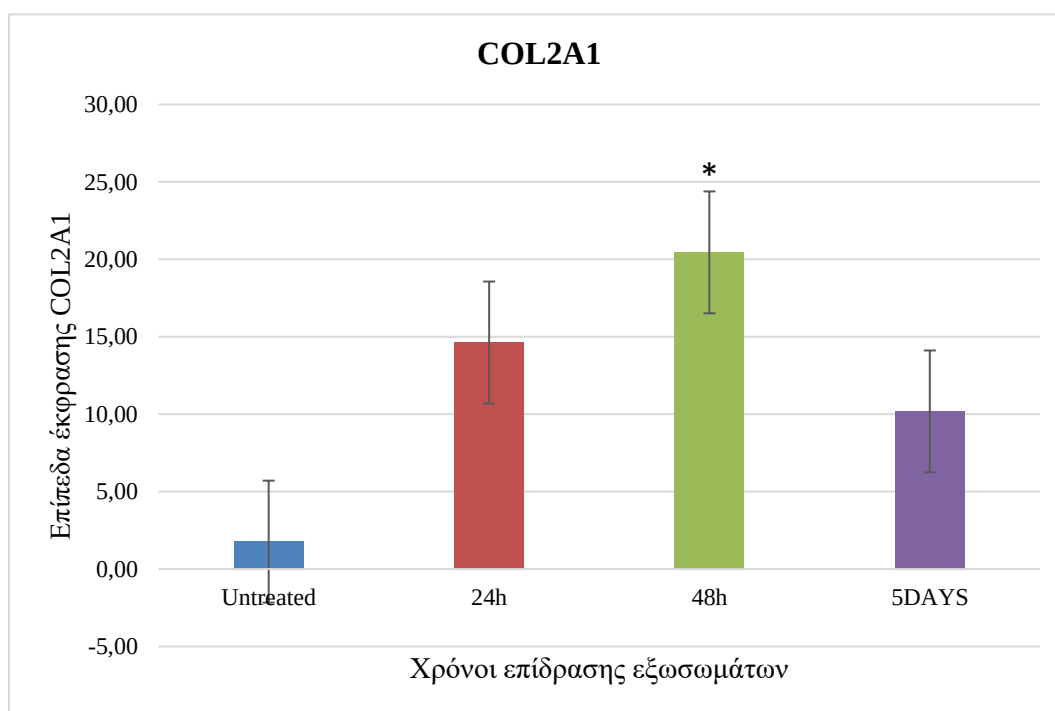
Εικόνα 20: Γραφική απεικόνιση της κινητικότητας των χονδροκυττάρων μετά από επίδραση εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSCs στις χρονικές στιγμές 24h και 48h

4.7. Προσδιορισμός μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των COL1A1, MMP-13, ACAN, ADAMTS-5, SOX9 και COMP σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μετά την επίδραση με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

Τα COL1A1, MMP-13, ACAN, ADAMTS-5, SOX9 και COMP αποτελούν μερικούς από τους χαρακτηριστικούς δείκτες της οστεοαρθρίτιδας. Στην παρούσα εργασία, τα mRNA επίπεδα της έκφρασης τους μελετήθηκαν με την μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) στους διαφορετικούς χρόνους επώασης με iMSCs-exos σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Στην συνέχεια, ακολούθησε σύγκριση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης τους μεταξύ των κυττάρων που δεν επώαστηκαν με εξωσώματα (NT – untreated) με τα κύτταρα που επώαστηκαν με εξωσώματα στις τρεις χρονικές στιγμές (24h, 48h και 5days).

4.7.1. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης του COL2A1

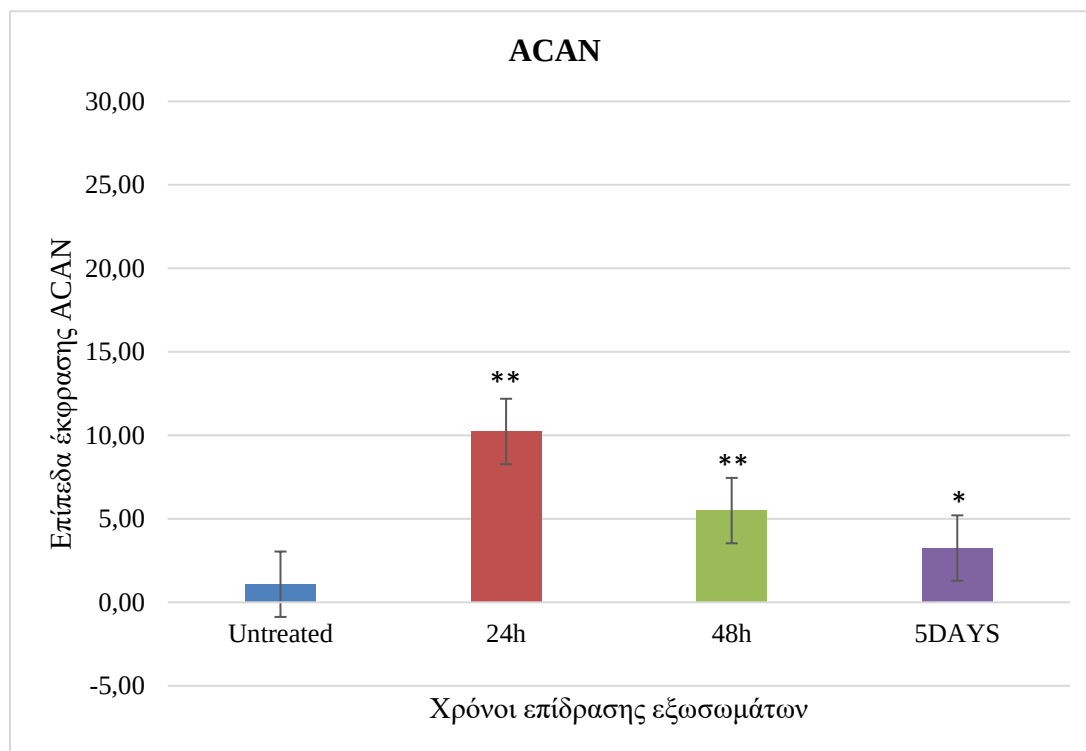
Τα αποτελέσματα της μεταγραφικής έκφρασης του COL2A1 μετά από επίδραση με iMSCs-exos που προκύπτουν από την μέθοδο RT-PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα 21. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι στις 24 και 48 ώρες, τα επίπεδα έκφρασης είναι αυξανόμενα και στις 5 μέρες παρατηρείται μείωσή τους. Παρόλα αυτά, στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της παρατηρούνται μόνο στις 48 ώρες με τιμή $p = 0,035$ ($p < 0.05$). Αντίθετα, στις 24 ώρες και στις 5 μέρες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).



Εικόνα 21: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης του COL2A1 σε διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs (* $p < 0.05$)

4.7.2. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της ACAN

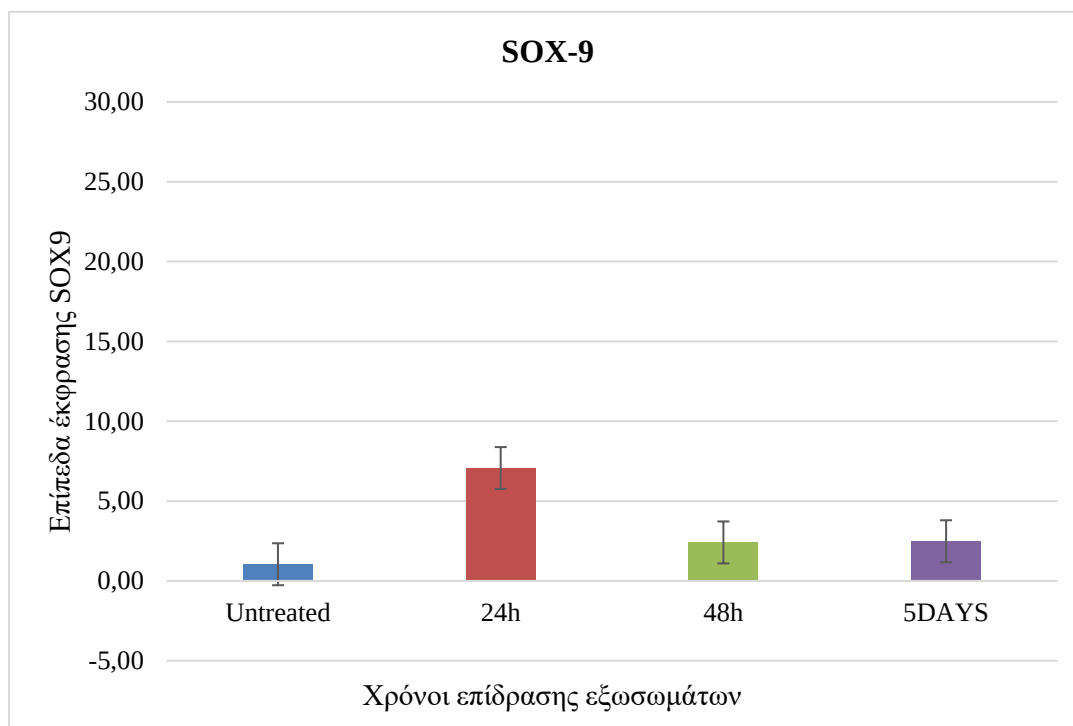
Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της RT-PCR της ACAN μετά από επίδραση με iMSCs-exos. Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της αγγρεκάνης κυρίως στις 24 ώρες, ενώ μετά τις 24 ώρες τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται προοδευτικά (48h, 5days). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλους τους χρόνους επίδρασης εξωσωμάτων. Συγκεκριμένα, στις 24h η τιμή p-value είναι 0,01, στις 48h η τιμή p-value είναι 0,003 και στις 5 μέρες η τιμή p-value είναι 0,04 ($p < 0.05$).



Εικόνα 22: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης της ACAN στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

4.7.3. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης του SOX9

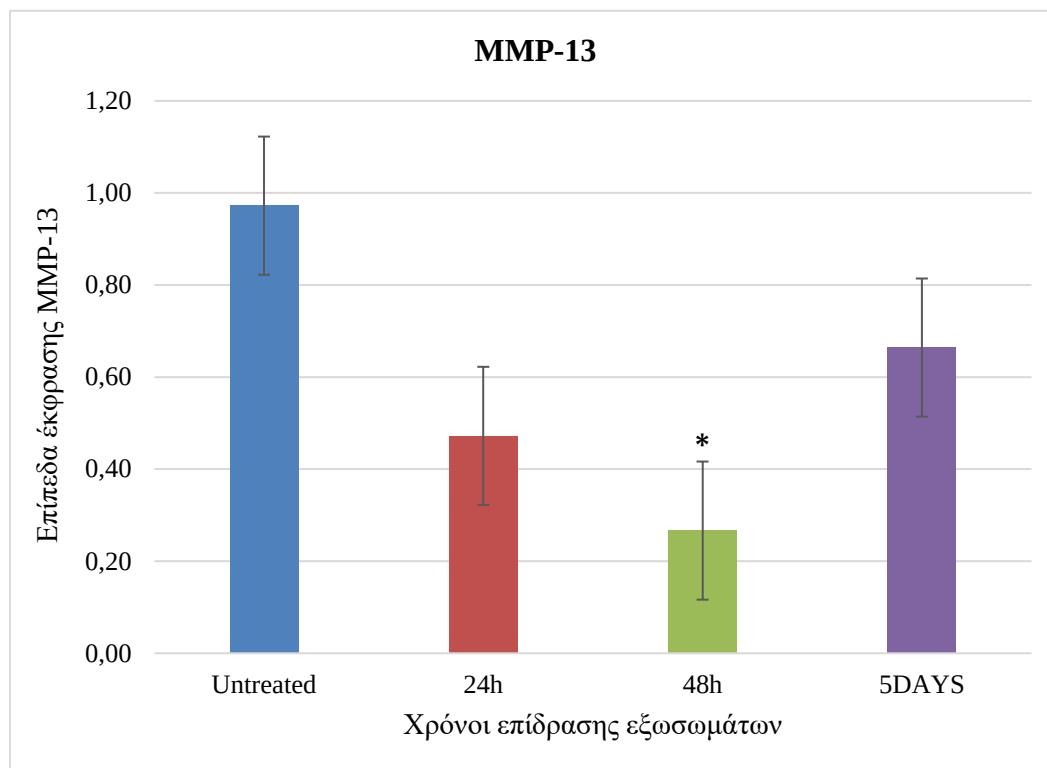
Η επίδραση των εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSCs στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα SOX9 παρουσιάζεται στην Εικόνα 23. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης ($p > 0.05$). Τα mRNA επίπεδα έκφρασης του SOX9 αυξάνονται και στους 3 χρόνους επίδρασης των εξωσωμάτων, με μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στις 24h ($p = 0,144$). Στις 48h και 5 μέρες αν και τα επίπεδα του SOX9 είναι αυξημένα συγκριτικά με το NT, η έκφρασή του είναι μειωμένη συγκριτικά με τις 24 ώρες.



Εικόνα 23: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης του SOX9 στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

4.7.4. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της MMP-13

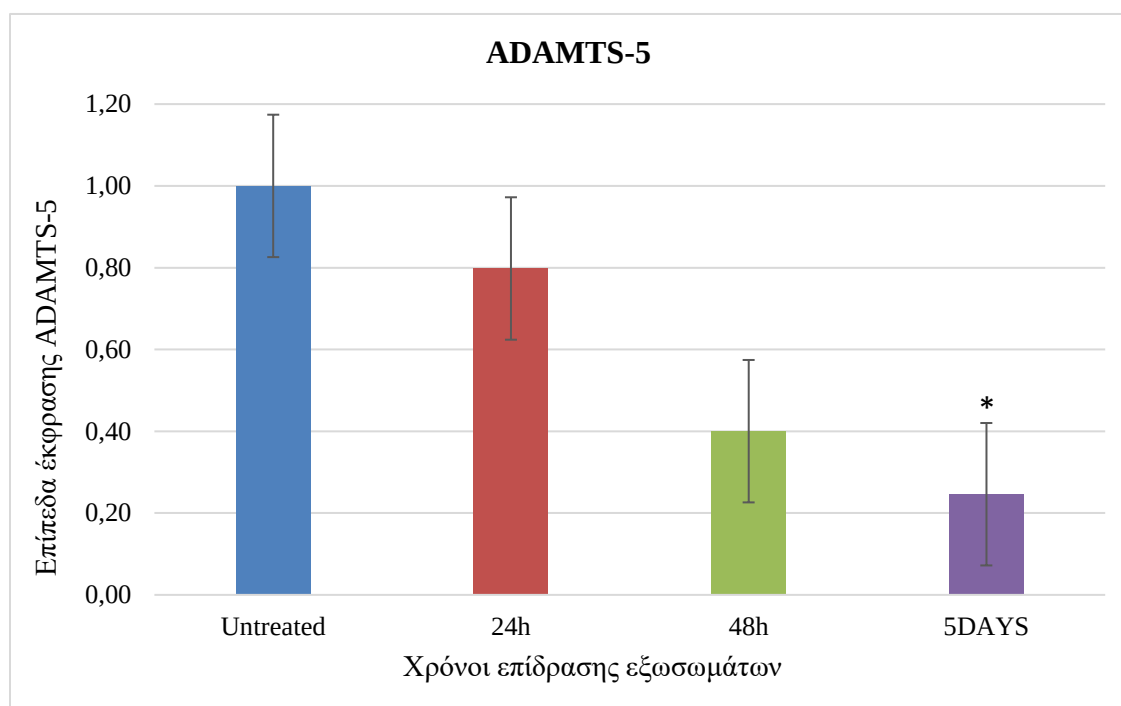
Η επίδραση των εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSCs μειώνει προοδευτικά τα mRNA επίπεδα έκφρασης της MMP-13 μέχρι τις 48 ώρες ενώ στις 5 μέρες παρατηρείται απότομη αύξηση (Εικόνα 24). Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στις 48 ώρες ($p\text{-value}=0,05$) συγκριτικά με τις 48 ώρες και τις 5 μέρες.



Εικόνα 24: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης της MMP-13 στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

4.7.5. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της ADAMTS-5

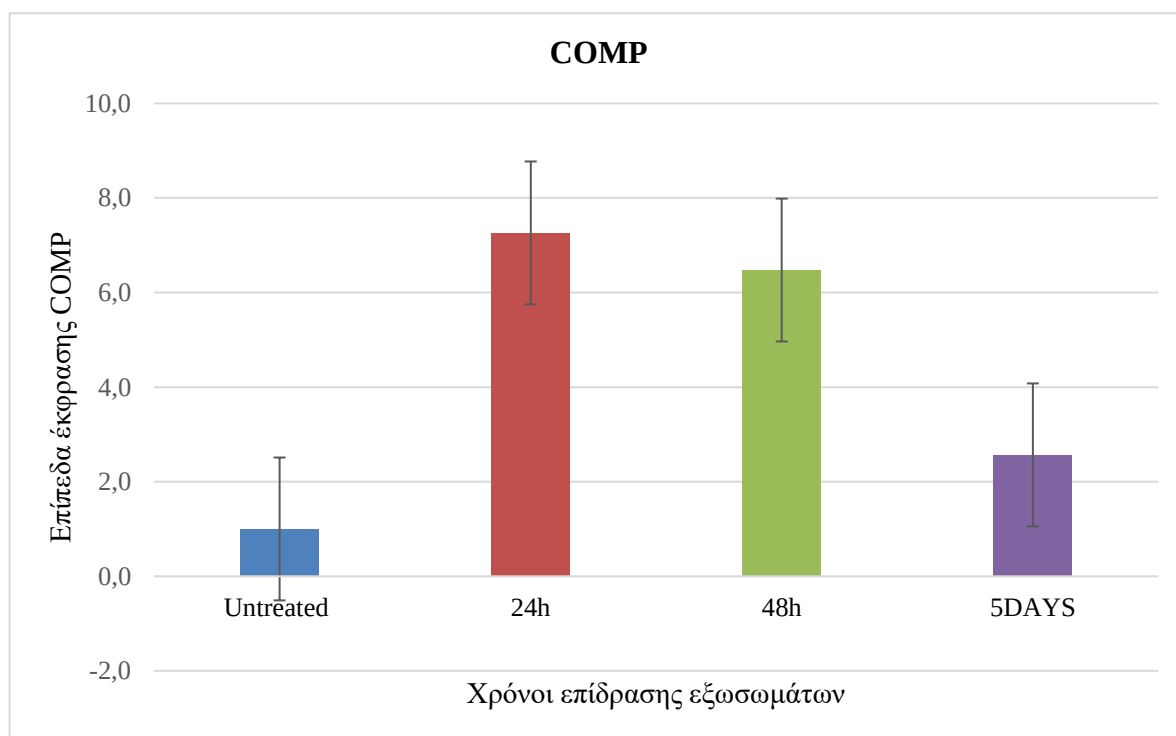
Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής mRNA επιπέδων έκφρασης της ADAMTS-5, όπου παρατηρείται σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του μετά την επίδραση με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs. Η μείωση της έκφρασης του είναι στατιστικά σημαντική μόνο στις 5 μέρες με τιμή p-value 0,03 ($p < 0.05$), ενώ στις 24h και 48h οι τιμές p-value δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$).



Εικόνα 25: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης του ADAMTS-5 στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs (* $p < 0.05$)

4.7.6. Προσδιορισμός mRNA επιπέδων έκφρασης της COMP

Από τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν για τα mRNA επίπεδα έκφρασης της COMP παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της και στους 3 διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs συγκριτικά με τα untreated δείγματα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της στις 24 ώρες και στην συνέχεια, στις 48 ώρες και στις 5 μέρες τα επίπεδα μειώνονται προοδευτικά (Εικόνα 26). Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κανένα χρόνο επίδρασης των εξωσωμάτων ($p > 0.05$).



Εικόνα 26: Γραφική απεικόνιση mRNA επιπέδων έκφρασης της COMP στους διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με εξωσώματα προερχόμενα από iMSCs

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΟΑ είναι η πιο κοινή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων με πολυπαραγοντικό χαρακτήρα. Οι διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν έχουν καταφέρει να συμβάλλουν στην αναγέννηση του χόνδρου αλλά περιορίζονται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της, χωρίς όμως μόνιμα αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί θεραπευτικές προσεγγίσεις με σημαντικότερη την κυτταρική θεραπεία με χρήση βλαστικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην χρήση iMSCs τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερες αναγεννητικές ικανότητες και στα εξωκυτταρικά κυστίδια που εκκρίνουν, τα εξωσώματα (*Aldoghachi et al., 2023; Lach et al., 2022, Ni et al., 2020, Wu et al., 2023*).

Ωστόσο, η παρακρινής δράση των iMSCs δεν είναι απόλυτα κατανοητή και για αυτό, σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSCs με στόχο την διερεύνηση του πιθανού θεραπευτικού ρόλου τους στην ΟΑ. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση εξωσωμάτων από iMSCs (iMSCs-exos) και στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης τους έγινε χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) (στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ), όπου παρατηρήθηκε το σφαιρικό σχήμα τους, η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα και το μέγεθος τους (30-150nm) (*Ni et al., 2020*). Ακολούθως, η επιβεβαίωση της απομόνωσης και ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών που βρίσκονται στην επιφάνειά τους, όπως τα CD63 και CD81 με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot). Τα αποτελέσματα της Western blot δηλώνουν την ύπαρξη αυτών των επιφανειακών πρωτεϊνικών δεικτών επιβεβαιώνοντας την επιτυχή απομόνωση των εξωσωμάτων καθώς επίσης, εκτιμήθηκε και η συγκέντρωσή τους σε διαφορετικούς όγκους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών δεικτών, με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρουσιάζει ο πρωτεϊνικός δείκτης CD81 συγκριτικά με το CD63. Οι τετρασπανίνες CD63 και CD81 βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εξωσώματα συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις τους στα κύτταρα από τα οποία εκκρίνονται τα εξωσώματα (κύτταρα προέλευσης) και εμπλέκονται σε κομβικές βιολογικές διεργασίες μεταξύ των οποίων, στην βιογένεση των εξωσωμάτων, στην στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων, στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην πρόσληψη των εξωσωμάτων από τα κύτταρα – στόχους. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείκτη CD81 σχετίζεται με την κυτταρική μετανάστευση, με την

ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού αλληλεπιδρώντας με τα B - λεμφοκύτταρα και έμμεσα με την θεραπευτική ικανότητα των εξωσωμάτων (Rydland *et al.*, 2023). Ο πρωτεϊνικός δείκτης CD63 σχετίζεται με την βιογένεση των εξωσωμάτων καθώς εκφράζεται από τα αρχικά στάδια της (πρώιμο ενδόσωμα) (Lee *et al.*, 2019). Η βιβλιογραφία επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών δεικτών, δηλώνοντας ότι η αυξημένη συγκέντρωση του CD81 σχετίζεται με την αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα των χονδροκυττάρων μετά την επίδραση τους με εξωσώματα από iMSCs.

Μετά την επιτυχή απομόνωση των iMSCs-exos, ακολούθησε έμμεση ποσοτικοποίηση των ολικών εξωσωμικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford σε διαφορετικούς όγκους θρεπτικού υλικού, όπου παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται ο όγκος του θρεπτικού υλικού αυξάνεται και η συγκέντρωση τους.

Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών, αφού τα εξωσώματα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, ακολούθησε η διερεύνηση της ικανότητας πρόσληψης των εξωσωμάτων από φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε χρώση των εξωσωμάτων με χρωστική η οποία, αλληλεπιδρά με την λιπιδιακή μεμβράνη των εξωσωμάτων και την χρωματίζει με πράσινο φθοριόχρωμα. Έπειτα, φυσιολογικά χονδροκύτταρα επώαστηκαν με τα εξωσώματα αυτά και στην συνέχεια, παρατηρήθηκε η ένταση του πράσινου φθορισμού. Οι εικόνες του μικροσκοπίου φθορισμού επιβεβαίωσαν την ικανότητα των χονδροκυττάρων να προσλαμβάνουν εξωσώματα, αφού παρατηρήθηκαν εξωσώματα στο κυτταρόπλασμα και γύρω από τον πυρήνα των κυττάρων, δηλώνοντας την είσοδο και παρουσία τους μέσα στα κύτταρα (Lu *et al.*, 2021; Sheng *et al.*, 2021).

Το επόμενο πειραματικό στάδιο ήταν ο έλεγχος της επίδρασης των iMSCs-εξωσωμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση φυσιολογικών χονδροκυττάρων, μέσω της τεχνικής Wound Healing – Scratch Assay. Φυσιολογικά χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία iMSCs-εξωσωμάτων σε δύο χρόνους επώασης, 24 και 48 ώρες. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η επίδραση των iMSCs-εξωσωμάτων προάγει την κυτταρική μετανάστευση και στις 2 χρονικές στιγμές. Μεγαλύτερη κυτταρική μετανάστευση παρατηρήθηκε στις 48 ώρες, σε ποσοστό 81,74% συγκριτικά με τις 24h (55,38%), δηλώνοντας την αναγεννητική ικανότητα των iMSCs-εξωσωμάτων. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει μελέτες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία, όπου τα εξωσώματα προερχόμενα από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι ικανά να αυξάνουν τους ρυθμούς επούλωσης τραυμάτων μέσω της αγγειογένεσης και της παραγωγής

κολλαγόνου, προάγοντας τη ανάπλαση την ECM (Kim et al., 2018; J. Zhang et al., 2015; A. K. Zhou et al., 2023). Μελέτη των Kim et al., 2018 έδειξε ότι τα iMSCs-εξωσώματα συμβάλλουν σε μεγαλύτερο βαθμό την επούλωση πληγών σε κύτταρα του δέρματος (ινοβλάστες) σε 24 και 48 ώρες συγκριτικά με MSCs-εξωσώματα (Kim et al., 2018). Όσον αφορά την OA, μελέτη των Zhu et al., 2017 παρουσίασε την αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης σε χονδροκύτταρα μετά την επίδραση εξωσωμάτων από iMSCs, σε πειραματικό μοντέλο ποντικού (Zhu et al., 2017).

Ακολούθως, μετά τη συμβολή των iMSCs-εξωσωμάτων στην κυτταρική μετανάστευση, πραγματοποιήθηκε μελέτη χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών της OA. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με iMSCs-exos σε διαφορετικούς χρόνους επίδρασης. Τα OA χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία των iMSCs-exos για 24 ώρες, 48 ώρες και για 5 μέρες και στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού τους RNA, μετατροπή του RNA σε cDNA και μελέτη των mRNA επιπέδων έκφρασης των COL2A1, SOX9, ACAN, MMP-13, ADAMTS-5 και COMP, μέσω της μεθόδου RT-PCR. Τα αποτελέσματα των γονιδίων συγκρίθηκαν με καλλιέργειες χονδροκυττάρων χωρίς την παρουσία εξωσωμάτων (NT, Untreated). Σε OA χονδροκύτταρα (NT) παρατηρήθηκαν μειωμένα mRNA επίπεδα έκφρασης των COL2A1, SOX9 και ACAN και αυξημένα mRNA επίπεδα έκφρασης των MMP-13, ADAMTS-5 και COMP, αντικατοπτρίζοντας τον φαινότυπο της OA.

Τα αποτελέσματα της RT-PCR για το COL2A1 μετά την επίδραση με iMSCs-exos έδειξαν αύξηση των mRNA επιπέδων έκφρασής του στις τρεις χρονικές στιγμές, με στατιστικά σημαντική διαφορά να παρατηρείται στις 48 ώρες. Αυτό δηλώνει ότι σε 48 ώρες, η επαγόμενη αύξηση της έκφρασης του COL2A1 πιθανά να συμβάλλει στην αναστροφή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου και στην ανάπλαση της ECM. Μελέτη των Yassin et al., 2020 έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του COL2A1 αυξάνονται και διατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα μέχρι και 7 μήνες μετά την έγχυση αντιφλεγμονώδους ουσίας (Yassin et al., 2020). Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μειώνονται στις 5 μέρες δηλώνοντας ότι η επίδραση των εξωσωμάτων δεν είναι μόνιμη αλλά παροδική.

Ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα mRNA επίπεδα έκφρασης της ACAN, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές επίδρασης των iMSCs-exos. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της

παρατηρήθηκε στις 24 ώρες συγκριτικά με τα NT χονδροκύτταρα. Ακολούθως, στις 48 ώρες και 5 μέρες, αν και τα επίπεδα έκφρασης είναι αυξημένα συγκριτικά με τα NT χονδροκύτταρα, αρχίζουν να μειώνονται προοδευτικά. Κατά την έναρξη της OA, η ACAN αρχίζει να διασπάται από μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθιστώντας την ανίκανη να προστατεύσει το COL2A1 από αποικοδόμηση και έτσι, η ECM αρχίζει να αποικοδομείται (*Chambers et al., 2002*). Ωστόσο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ACAN εμφανίζει μεγαλύτερη αναγεννητική ικανότητα από το COL2A1 (*Li et al., 2022*). Αυτό εξηγεί τα αποτελέσματα της συγκριτικά με τα αποτελέσματα του COL2A1, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται στις 5 μέρες.

Η επίδραση των iMSCs-exos αύξησε σημαντικά τα mRNA επίπεδα έκφρασης του SOX9 και στις 3 χρονικές στιγμές, χωρίς όμως να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση σε κανένα χρόνο επίδρασης. Μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης του παρατηρήθηκε στις 24h συγκριτικά με τις 48h και τις 5 μέρες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το SOX9 προάγει την έκφραση του COL2A1. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά του με αυτά του COL2A1 επιβεβαιώνεται ότι η αύξηση της έκφρασης του SOX9 επάγει την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του COL2A1. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με άλλες μελέτες, όπου η απουσία του SOX9 σε ποντίκια, προκάλεσε καταστολή της έκφρασης διάφορων τύπων κολλαγόνου και της αγγρεκάνης (*Bi et al., 1999; Fujii et al., 2022*)

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των mRNA επιπέδων έκφρασης της MMP-13, παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση των επιπέδων έκφρασής του μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ στις 5 μέρες παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στις 48h. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του στις 24 και 48 ώρες δηλώνει ότι η επίδραση των iMSCs-exos καταστέλλει την αυξημένη αποικοδομητική του δραστηριότητα στα COL2A1, ACAN και SOX9. Τα δεδομένα συμφωνούν με πλήθος μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, δηλώνοντας ότι η MMP-13 αποτελεί γονιδιακό στόχο σε θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί έως τώρα καθώς και στην ανάπτυξη θεραπειών με την χρήση αναστολέων του (*Destouni et al., 2021; Hu & Ecker, 2021; Li et al., 2022; Porter et al., 2005*).

Προοδευτική μείωση των mRNA επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκε και για την ADAMTS-5 και στους τρεις διαφορετικούς χρόνους, με στατιστικά σημαντική μείωση να παρατηρείται στις 5 μέρες μετά την επίδραση των εξωσωμάτων. Η μειωμένη έκφραση της καταστέλλει την αποικοδομητική του δραστηριότητα στην ACAN (της οποίας τα επίπεδα της είναι αυξημένα και στους 3 χρόνους επίδρασης των εξωσωμάτων), συμβάλλοντας στην αναγέννηση της ECM.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μελέτες σε ζωικά μοντέλα της OA συσχέτισαν την αυξημένη δραστηριότητα του ADAMTS-5 με την εξέλιξη της πάθησης και μελέτες knock out του γονιδίου οδήγησαν σε μείωση της αποικοδόμησης της ECM (*Elsadek et al., 2021; Song et al., 2007*).

Τέλος τα αποτελέσματα της επίδρασης των iMSCs-exos στα mRNA επίπεδα έκφρασης του COMP δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του και στους τρεις διαφορετικούς χρόνους επίδρασης συγκριτικά με το untreated δείγμα. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στις 24h, ενώ στις 48h και 5 μέρες τα επίπεδα του μειώνονται σταδιακά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ρόλος του COMP στην OA είναι ασαφής και τα επίπεδα έκφρασης του είναι διαφορετικά μεταξύ του πρώιμου και του τελικού σταδίου της OA λόγω της προσπάθειας του να επιδιορθώσει τις αλλοιώσεις που υφίσταται ο χόνδρος. Αυτό εξηγεί και τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα οποία παρουσιάζουν ότι η επίδραση των εξωσωμάτων αυξάνει τα επίπεδα έκφρασής του με σκοπό να επιδιορθώσει την κατεστραμμένη ECM. Οι πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής παρουσιάζουν διφορούμενα αποτελέσματα για την δράση του COMP. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν την συμβολή του γονιδίου στην εξέλιξη της OA, μέσω αυξημένης αποικοδόμησης της ECM (*Koelling et al., 2006; Mishra et al., 2019; Sharif et al., 2004*). Οι *Koelling et al., 2006*, αναφέρουν όμως ότι το COMP, με την ικανότητα δέσμευσης και αλληλεπίδρασης του με άλλα μόρια της ECM, συμπεριλαμβανομένου και του κολλαγόνου τύπου II, μπορεί να συμβάλλει στην ανάπλαση της ECM στα τελικά στάδια της OA (*Koelling et al., 2006*).

Συμπερασματικά, η χρήση εξωσωμάτων προερχόμενων από iMSC σε μη κυτταρικές θεραπείες έχει αναδείξει σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της ασφάλειάς τους, της χαμηλής ανοσογονικότητάς τους και της απουσίας σχηματισμού όγκων στην αναγεννητική ιατρική. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί και ερωτηματικά σχετικά με την χρήση τους, όπως επίσης σχετικά άγνωστη παραμένει και η παρακρινής δράση τους στην OA. Επιπλέον, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα διπλωματική εργασία δηλώνουν ότι η επίδραση των iMSCs - εξωσωμάτων στην μεταβολή της έκφρασης χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών της OA είναι παροδική, καθώς φαίνεται ότι κυρίως μετά τις 48 ώρες, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών τείνουν να επιστρέφουν στα αρχικά επίπεδα που έχουν στην OA. Για αυτούς τους λόγους, είναι αναγκαίες μελλοντικές μελέτες που θα αναδείξουν τρόπους με

τους οποίους η επίδραση των iMSCs - εξωσωμάτων θα παραμένει σταθερή για μεγάλα χρονικά διαστήματα εντός της άρθρωσης. Τέλος, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ζωικό μοντέλο της νόσου για την διερεύνηση του ρόλου των iMSCs - εξωσωμάτων στη πιθανή αναγέννηση του χόνδρου και στην θεραπεία της ΟΑ.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *The Medical Clinics of North America*, 104(2), 293–311.
<https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2019.10.007>
- Aldoghachi, A. F., Loh, J. K., Wang, M. L., Yang, Y. P., Chien, C. S., Teh, H. X., Omar, A. H., Cheong, S. K., Yeap, S. K., Ho, W. Y., & Ong, A. H. K. (2023). Current developments and therapeutic potentials of exosomes from induced pluripotent stem cells-derived mesenchymal stem cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 86(4), 356–365.
<https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000899>
- Bellin, G., Gardin, C., Ferroni, L., Chachques, J. C., Rogante, M., Mitrečić, D., Ferrari, R., & Zavan, B. (2019). Exosome in Cardiovascular Diseases: A Complex World Full of Hope. *Cells*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/CELLS8020166>
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22(1), 85–89.
<https://doi.org/10.1038/8792>
- Bortoluzzi, A., Furini, F., & Scirè, C. A. (2018). Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 17(11), 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2018.06.002>
- Chambers, M. G., Kuffner, T., Cowan, S. K., Cheah, K. S. E., & Mason, R. M. (2002). Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(1), 51–61. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0481>
- Charlier, E., Deroyer, C., Ciregia, F., Malaise, O., Neuville, S., Plener, Z., Malaise, M., & Seny, D. (2019). Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochemical Pharmacology*, 165, 49–65. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.02.036>
- Destouni, A., Tsois, K. C., Economou, A., Papathanasiou, I., Balis, C., Mourmoura, E., & Tsezou, A. (2021). Chondrocyte protein co-synthesis network analysis links ECM mechanosensing to metabolic adaptation in osteoarthritis. *Expert Review of Proteomics*, 18(7), 623–635. <https://doi.org/10.1080/14789450.2021.1962299>
- Duan, L., Xu, X., Xu, L., Chen, H., Li, X., Alahdal, M., Xiao, Y., Liang, Y., & Xia, J. (2021). Exosome-Mediated Drug Delivery for Cell-Free Therapy of Osteoarthritis. *Current Medicinal Chemistry*, 28(31), 6458–6483.
<https://doi.org/10.2174/0929867327666201118161232>
- Elsadek, B. E. M., Abdelghany, A. A., Abd EL-Aziz, M. A., Madkor, H. R., Abd Elrady Ahmed, A., Abd-Elghaffar, S. K., & Elsadek, A. A. M. (2021). Validation of the Diagnostic and

- Prognostic Values of ADAMTS5 and FSTL1 in Osteoarthritis Rat Model. *Cartilage*, 13(2_suppl), 1263S-1273S. <https://doi.org/10.1177/1947603519852405>
- Fan, Y., Li, Z., & He, Y. (2022). Exosomes in the Pathogenesis, Progression, and Treatment of Osteoarthritis. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9030099>
- Fujii, Y., Liu, L., Yagasaki, L., Inotsume, M., Chiba, T., & Asahara, H. (2022). Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS23116316>
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., & Volarevic, V. (2019). Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 109, 2318–2326. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.11.099>
- He, L., He, T., Xing, J., Zhou, Q., Fan, L., Liu, C., Chen, Y., Wu, D., Tian, Z., Liu, B., & Rong, L. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01781-W>
- He, N., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, D., & Ye, H. (2020). Exosomes: Cell-Free Therapy for Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 13(5), 713–721. <https://doi.org/10.1007/S12265-020-09966-7>
- Hu, Q., & Ecker, M. (2021). Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041742>
- Hua, Z., Li, S., Liu, Q., Yu, M., Liao, M., Zhang, H., Xiang, X., & Wu, Q. (2022). Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promotes Osteogenic Potential of iPSC-Derived MSCs but Fails to Simplify the iPSC-EB-MSC Differentiation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.841778>
- Johnson, V. L., & Hunter, D. J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 28(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/J.BERH.2014.01.004>
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 7(1), 33–42. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2010.196>
- KELLGREN, J. H., & LAWRENCE, J. S. (1957). Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4), 494–502. <https://doi.org/10.1136/ARD.16.4.494>

- Kim, S., Lee, S. K., Kim, H., & Kim, T. M. (2018). Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Skin Cell Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19103119>
- Koelling, S., Clauditz, T. S., Kaste, M., & Miosge, N. (2006). Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8(3), R56. <https://doi.org/10.1186/AR1922>
- Konteles, V., Papathanasiou, I., Tzetis, M., Goussetis, E., Trachana, V., Mourmoura, E., Balis, C., Malizos, K., & Tsezou, A. (2023). Integration of Transcriptome and MicroRNA Profile Analysis of iMSCs Defines Their Rejuvenated State and Conveys Them into a Novel Resource for Cell Therapy in Osteoarthritis. *Cells*, 12(13), 1756. <https://doi.org/10.3390/CELLS12131756>
- Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., Imai, M., Tamura, T., Kita, T., & Kimura, T. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 4(4), 446–454. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958975>
- Lach, M. S., Rosochowicz, M. A., Richter, M., Jagiełło, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2022). The Induced Pluripotent Stem Cells in Articular Cartilage Regeneration and Disease Modelling: Are We Ready for Their Clinical Use? *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS11030529>
- Lee, S. S., Won, J. H., Lim, G. J., Han, J., Lee, J. Y., Cho, K. O., & Bae, Y. K. (2019). A novel population of extracellular vesicles smaller than exosomes promotes cell proliferation. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12964-019-0401-Z>
- Li, T., Peng, J., Li, Q., Shu, Y., Zhu, P., & Hao, L. (2022). The Mechanism and Role of ADAMTS Protein Family in Osteoarthritis. *Biomolecules*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/BIOM12070959>
- Liang, G., Kan, S., Zhu, Y., Feng, S., Feng, W., & Gao, S. (2018). Engineered exosome-mediated delivery of functionally active miR-26a and its enhanced suppression effect in HepG2 cells. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 585–599. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154458>
- Loo, S. J. Q., & Wong, N. K. (2021). Advantages and challenges of stem cell therapy for osteoarthritis (Review). *Biomedical Reports*, 15(2). <https://doi.org/10.3892/BR.2021.1443>
- Lu, H., Zhang, Y., Xiong, S., Zhou, Y., Xiao, L., Ma, Y., Xiao, Y., & Wang, X. (2021). Modulatory Role of Silver Nanoparticles and Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Modified Barrier Membrane on Macrophages and Osteogenesis. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.699802>

- Ma, M., Cui, G., Liu, Y., Tang, Y., Lu, X., Yue, C., & Zhang, X. (2023). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, osteoimmunology and orthopedic diseases. *PeerJ*, *11*, e14677. <https://doi.org/10.7717/peerj.14677>
- Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, *27*(3), 172–188. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2016.11.003>
- Mehana, E. S. E., Khafaga, A. F., & El-Blehi, S. S. (2019). The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sciences*, *234*. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.116786>
- Meliconi, R., & Pulsatelli, L. (2019). Are mechanisms of inflammation joint-specific in osteoarthritis? *Rheumatology (Oxford, England)*, *58*(5), 743–745. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEY300>
- Mishra, A., Awasthi, S., Raj, S., Mishra, P., & Srivastava, R. N. (2019). Identifying the role of ASPN and COMP genes in knee osteoarthritis development. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/S13018-019-1391-7>
- Mobasheri, A., Rayman, M. P., Gualillo, O., Sellam, J., Van Der Kraan, P., & Fearon, U. (2017). The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, *13*(5), 302–311. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2017.50>
- Ni, Z., Zhou, S., Li, S., Kuang, L., Chen, H., Luo, X., Ouyang, J., He, M., Du, X., & Chen, L. (2020). Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Research*, *8*(1), 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-0100-9>
- Paskevicius, T., Farraj, R. A., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2023). Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone. *Cells*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030403>
- Peláez, P., Damiá, E., Torres-Torrillas, M., Chicharro, D., Cuervo, B., Miguel, L., Del Romero, A., Carrillo, J. M., Sopena, J. J., & Rubio, M. (2021). Cell and Cell Free Therapies in Osteoarthritis. *Biomedicines*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9111726>
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., & Edwards, D. R. (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical Journal*, *386*(Pt 1), 15–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20040424>
- Primorac, D., Molnar, V., Rod, E., Jeleč, Ž., Čukelj, F., Matišić, V., Vrdoljak, T., Hudetz, D., Hajsok, H., & Borić, I. (2020). Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*, *11*(8), 1–35. <https://doi.org/10.3390/GENES11080854>

- Rydland, A., Heinicke, F., Flåm, S. T., Mjaavatten, M. D., & Lie, B. A. (2023). Small extracellular vesicles have distinct CD81 and CD9 tetraspanin expression profiles in plasma from rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Medicine*, 23(6). <https://doi.org/10.1007/S10238-023-01024-1>
- S, C., C, G., P, C., MA, S., F, I., P, M., P, L., C, M., M, I., A, D. G., & G, M. (2018). Clinical evidence of traditional vs fast track recovery methodologies after total arthroplasty for osteoarthritic knee treatment. A retrospective observational study. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 7(3), 504. <https://doi.org/10.11138/MLTJ/2017.7.3.504>
- Sabapathy, V., & Kumar, S. (2016). hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(8), 1571–1588. <https://doi.org/10.1111/JCMM.12839>
- Sacitharan, P. K. (2019). Ageing and Osteoarthritis. *Sub-Cellular Biochemistry*, 91, 123–159. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_6
- Segarra-Queralt, M., Piella, G., & Noailly, J. (2023). Network-based modelling of mechano-inflammatory chondrocyte regulation in early osteoarthritis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1006066/FULL>
- Sharif, M., Kirwan, J. R., Elson, C. J., Granell, R., & Clarke, S. (2004). Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years. *Arthritis and Rheumatism*, 50(8), 2479–2488. <https://doi.org/10.1002/ART.20365>
- Sharun, K., Muthu, S., Mankuzhy, P. D., Pawde, A. M., Chandra, V., Lorenzo, J. M., Dhama, K., Amarpal, & Sharma, G. T. (2022). Cell-free therapy for canine osteoarthritis: current evidence and prospects. *The Veterinary Quarterly*, 42(1), 224–230. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2145620>
- Sheng, X., Zhao, J., Li, M., Xu, Y., Zhou, Y., Xu, J., He, R., Lu, H., Wu, T., Duan, C., Cao, Y., & Hu, J. (2021). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Accelerate Functional Recovery After Spinal Cord Injury by Promoting the Phagocytosis of Macrophages to Clean Myelin Debris. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.772205>
- Song, R. H., Tortorella, M. D., Malfait, A. M., Alston, J. T., Yang, Z., Arner, E. C., & Griggs, D. W. (2007). Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis and Rheumatism*, 56(2), 575–585. <https://doi.org/10.1002/ART.22334>

- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology, Chapter 3*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30>
- Tseng, S., Reddi, A. H., & Di Cesare, P. E. (2009). Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomarker Insights, 4*(4), 33. <https://doi.org/10.4137/BMI.S645>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology, 9*(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/NCB1596>
- Vina, E. R., & Kwok, C. K. (2018). Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current Opinion in Rheumatology, 30*(2), 160–167. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000479>
- Wu, C., He, Y., Yao, Y., Yang, H., & Lu, F. (2023). Exosomes treating osteoarthritis: hope with challenge. *Heliyon, 9*(1). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E13152>
- Wu, X., Showiheen, S. A. A., Sun, A. R., Crawford, R., Xiao, Y., Mao, X., & Prasad, I. (2019). Exosomes Extraction and Identification. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2054*, 81–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9769-5_4
- Wyles, C. C., Houdek, M. T., Behfar, A., & Sierra, R. J. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications, 8*, 117. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S68073>
- Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., Zhong, Y., He, T., Chen, S., & Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy, 8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>
- Yassin, A. M., Abubakr, H. O., Abdelgalil, A. I., Khattab, M. S., El-Behairy, A. M., & Gouda, E. M. (2020). COL2A1 and Caspase-3 as Promising Biomarkers for Osteoarthritis Prognosis in an Equus asinus Model. *Biomolecules, 10*(3). <https://doi.org/10.3390/BIOM10030354>
- Zhang, J., Guan, J., Niu, X., Hu, G., Guo, S., Li, Q., Xie, Z., Zhang, C., & Wang, Y. (2015). Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of Translational Medicine, 13*(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0417-0>
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine, 15*, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

- Zhou, A. K., Jou, E., Lu, V., Zhang, J., Chabra, S., Abishek, J., Wong, E., Zeng, X., & Guo, B. (2023). Using Pre-Clinical Studies to Explore the Potential Clinical Uses of Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00557-6>
- Zhou, Q. fa, Cai, Y. zhi, & Lin, X. jin. (2020). The dual character of exosomes in osteoarthritis: Antagonists and therapeutic agents. *Acta Biomaterialia*, 105, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.040>
- Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., Zhang, J., Ding, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2017). Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-017-0510-9>