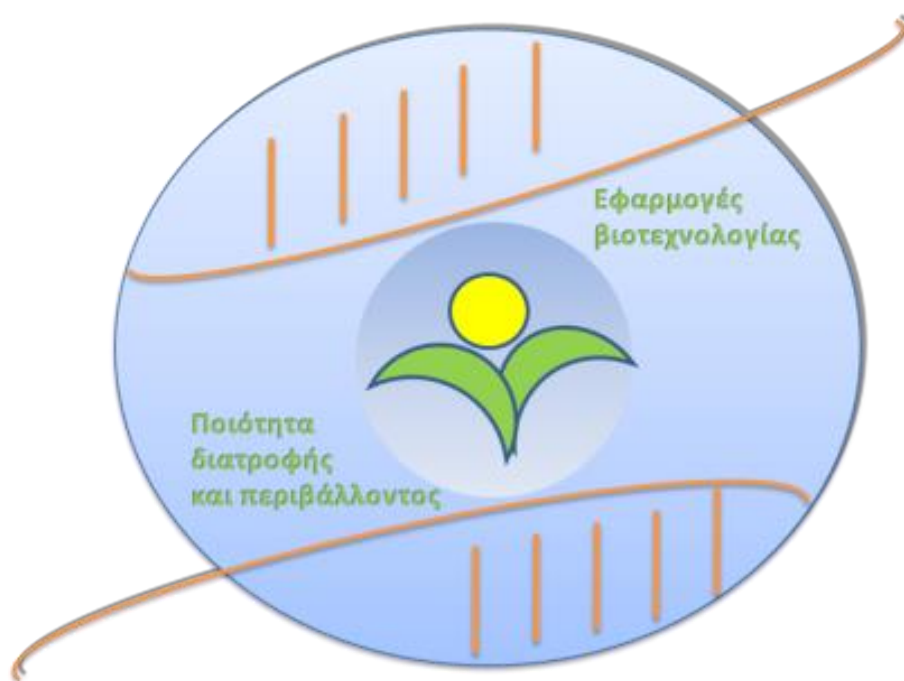




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΚΑΡΑΤΟΣΙΔΗ ΛΑΥΡΕΝΤΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2023

ΤΙΤΛΟΣ

“ Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων από γάλα”

TITLE

“Isolation and characterization of exosomes from milk”

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Μπαλατσός

Εργαστήριο: Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Μπαλατσός: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Βλαχάκης: Επίκουρος καθηγητής, ,
Γεωπονικό Πανεπιστημίου Αθηνών

Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα είναι η έκκριση από τον μαστικό αδένα των θηλαστικών, όπου ως πρωταρχική φυσική του λειτουργία έχει την θρέψη των νεογνών. Βοηθά στην σωστή θρέψη και ανάπτυξη των νεογνών, καθώς και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Γάλα ορισμένων ζώων όπως αγελάδες, βουβάλια, κατσίκες και πρόβατα χρησιμοποιείται και για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα βασικά συστατικά του γάλακτος είναι λίπη, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, βιταμίνες και ένζυμα. Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά νανοσωματίδια μεγέθους 30 - 150 nm, τα οποία έχουν πυκνότητα από 1,13 έως 1,19 g/mL. Βάση της μορφολογίας τους χαρακτηρίζονται ως πεπλατυσμένες σφαίρες με κυπελλοειδή σχήμα. Η εξωτερική τους μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια και πρωτεΐνες, καθώς το περιεχόμενό τους αποτελείται από πληθώρα βιομορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, και διάφορα νουκλεϊκά οξέα, όπως microRNA, lncRNA και mRNA. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular Vesicles, EVs) περιεγράφηκαν για πρώτη φορά στις δεκαετίες του 1960 και 1970 και θεωρούνταν απλά κυτταρικά απόβλητα χωρίς ιδιαίτερο βιολογικό σκοπό. Ωστόσο, μόλις τη δεκαετία του 1990 αποδόθηκε στα EVs ένας ρόλος στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και έτσι απέκτησαν αυξημένη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα. Βάση του περιεχομένου τους δεδομένου ότι διατηρούν τη βιολογική τους δράση, τα εξωσώματα επηρεάζουν τα κύτταρα δέκτες παρέχοντας σε αυτά την πληροφορία των προγονικών τους κυττάρων. Εξωσώματα υπάρχουν στο γάλα όπως και σε όλα τα βιολογικά υγρά. Σκοπός της εργασίας είναι η επαλήθευση της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων από αίγιο, αγελαδινό και πρόβειο γάλα με προσθήκη PEG και διαφορικές υπερφυγοκεντρίσεις. , Ο χαρακτηρισμός αυτών έγινε με χρήση Western και εντοπισμό διαμεμβρανικών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, που αναμένονται σε αφθονία στα εξωσώματα, όπως οι Alix, Flotillin, CD9, CD83, CD63, TSG101 και HSP70. Ο συνδυασμός ήδη υπάρχοντων πρωτοκόλλων οδήγησε σε επιτυχή απομόνωση ακέραιων εξωσωμάτων, για περαιτέρω χρήση και διερεύνηση.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Εξωσώματα, γάλα, υπερφυγοκέντρωση, πρωτεΐνες εξωσωμάτων

ABSTRACT

Milk is secreted by the mammary gland of mammals, where its primary natural function is to nourish newborns. It helps in the proper nutrition and development of newborns, as well as in strengthening the immune system. Milk from certain animals such as cows, buffaloes, goats and sheep is also used for human consumption. The main components of milk are fats, carbohydrates, proteins, vitamins and enzymes. Exosomes are extracellular nanoparticles with a size of 30-150 nm, which have a density of 1,13 to 1,19 g/mL. Based on their morphology, they are characterised as flattened spheres with a cup-shape. Their outer membrane consists of lipids and proteins, as their content consists of a variety of biomolecules such as proteins, lipids, and various nucleic acids such as microRNA, lncRNA and mRNA. Extracellular Vehicles (EVs) were first described in the 1960s and 1970s and were considered simple cellular artefacts with no biological purpose. It was not until the 1990s that EVs were attributed a role in cell-to-cell communication, thus gaining increased attention from the scientific community. Based on their content since they retain their biological activity, exosomes influence the recipient cells by providing them with the information of their progenitor cells. Exosomes are present in milk as in all biological fluids. The aim of this work is to verify the technique of isolation of exosomes from heifer, cow and sheep milk by adding PEG and differential ultracentrifugation. These were characterized using Western analysis and identification of transmembrane and intracellular proteins, which are expected to be abundant in exosomes, such as Alix, Flotillin, CD83, CD63, TSG101, HSP70 and were found indeed verifying expectations in relation with the experiment results. The combination of existing protocols led to successful isolation of intact exosomes for further use and investigation.

KEYWORDS: exosomes, milk, ultracentrifugation, exosomal proteins

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ Λεωνίδα Δημήτριο και Δρ Δημήτριο Βλαχάκη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θέλω ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Διονύσιο Αντωνόπουλο για την βοήθεια του, δείχνοντάς μου τις καινούργιες τεχνικές που χρησιμοποίησα, τις συμβουλές και τη συμπαράσταση της. Επίσης να αναφέρω και να ευχαριστήσω το Project MilkSafe για την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω του φίλους μου και την οικογένεια μου, για την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και παρέμειναν στο πλευρό μου στα εύκολα και στα δύσκολα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Π Ρ Ω Τ Ο.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Πεδίο και πλαίσιο μελέτης	8
1.2 Έρευνα στα εξωσώματα	9
1.3 Σκοπός & στόχοι μελέτης	11
1.4 Περίγραμμα κεφαλαίων μελέτης	11
Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Δ Ε Υ Τ Ε Ρ Ο	13
2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ.....	13
2.1 Εξωσώματα	13
2.2 Βιογένεση των EVs και λειτουργία των εξωσωμάτων	15
2.3 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά.....	16
2.4 Θρεπτικά χαρακτηριστικά γάλακτος μηρυκαστικών (Υδατάνθρακες, Πρωτεΐνες, Λίπος, Βιταμίνες & Ένζυμα).....	18
2.5 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά – γάλα	21
2.6 Τεχνικές απομόνωσης εξωκυττάρων κυστιδίων	23
3 Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Τ Ρ Ι Τ Ο.....	28
3.1 Υλικά και μέθοδοι.....	28
3.2 Λύση εξωσωμάτων και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	31
3.3 Western Blot.....	33
3.4 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	34
3.5 Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων - Ανοσοανίχνευση	34
4 Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Τ Ε Τ Α Ρ Τ Ο.....	39
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Π Ρ Ω Τ Ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πεδίο και πλαίσιο μελέτης

Το μητρικό γάλα αποτελεί την ιδανική τροφή για το τελειόμηνο και πρόωρο νεογνό και έχει αδιαμφισβήτητα άμεσα και απώτερα οφέλη. Μεταξύ άλλων, προστατεύει από λοιμώξεις, ελαττώνει τον κίνδυνο νεκρωτικής εντεροκολίτιδας και αμφιβληστροειδοπάθειας των προώρων, βελτιώνει τη νευροαναπτυξιακή έκβαση και μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου αργότερα στη ζωή (ΙΤΑΠ, 2023). Το ερώτημα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα σχετίζεται με το ποιο ζωικό γάλα έχει την υψηλότερη φυλογενετική συγγένεια με το ανθρώπινο γάλα με βάση συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, και συνεπώς την υψηλότερη διατροφική αξία για τα νεογνά. Προτείνεται ο εντοπισμός επιγενετικών μηχανισμών μεταφοράς σήματος μέσω της ανάλυσης εξωσωμάτων,

Τα εξωσώματα είναι κυστίδια εξωκυττάριας μεμβράνης, των οποίων η βιογένεση μέσω εξωκυττάρωσης πολυκυτταρικών ενδοσωμάτων ανακαλύφθηκε το 1983. Από την ανακάλυψή τους πριν από 30 χρόνια, έχει καταστεί σαφές ότι τα εξωσώματα συμβάλλουν σε πολλές πτυχές της φυσιολογίας και των ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της διακυτταρικής επικοινωνίας. (Harding, Heuser & Stahl, 2013). Πριν 40 χρόνια, δύο άρθρα που δημοσιεύθηκαν με μία εβδομάδα διαφορά αναφέρουν ότι στα δικτυοερυθροκύτταρα, οι υποδοχείς τρανσφερίνης που συνδέονται με μικρά κυστίδια 50 nM κυριολεκτικά εκτοξεύονται από τα ωριμάζοντα δικτυοερυθροκύτταρα του αίματος στον εξωκυττάριο χώρο (Harding, Heuser and Stahl, JCB 1983· Pan and Johnstone, Cell 1983) -. Η ονομασία "εξώσωμα" για αυτά τα εξωκυτταρικά κυστίδια επινοήθηκε λίγα χρόνια αργότερα από τη Rose Johnstone, αν και ο όρος είχε πράγματι χρησιμοποιηθεί μερικά χρόνια νωρίτερα, όταν αναφερόταν σε άλλα θραύσματα μεμβρανών που απομονώθηκαν από βιολογικά υγρά (Trams et al., 1981). Ο όρος "σύμπλεγμα εξωσωμάτων" έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για μια εντελώς διαφορετική οντότητα: συγκεκριμένα, για το ενδοκυτταρικό σωματίδιο που εμπλέκεται στην επεξεργασία του RNA (Mitchell et al., 1997). Η σημασία αυτών των πρώιμων ανακαλύψεων αναγνωρίστηκε κατά τις τρεις δεκαετίες που μεσολάβησαν με μια

σχεδόν εκρηκτική ανάπτυξη στον τομέα των βιολογίας των εξωσωμάτων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφόρων εταιρειών (International Society for Extracellular Vesicles, ISEVs και The American Society for Exosomes and Microvesicles, ASEM και ακόμη και ενός ειδικού περιοδικού (Journal of Extracellular Vesicles, JEV).

1.2 Έρευνα στα εξωσώματα

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις δυνατότητες διαγνωστικών που βασίζονται στην ανάλυση των εξωσωμάτων, καθώς μπορεί να φέρουν την πρωτεΐνη ή RNA υπογραφές παθολογικών ή φυσιολογικών καταστάσεων των κυττάρων προέλευσης. Επειδή τα εξωσώματα μπορούν να διακινούνται από τις περιοχές των ιστών σε αίμα, τα ούρα ή άλλα σωματικά υγρά που είναι εύκολα προσβάσιμα, μπορούν να καταστήσουν τέτοιες υπογραφές διαθέσιμες για διαγνωστική αξιοποίηση.

Επιπλέον, η δυνατότητα των εξωσωμάτων που φέρουν RNA να επηρεάζουν ή να ρυθμίζουν τα κύτταρα του αποδέκτη υποδηλώνει τη δυνατότητα θεραπευτικών εφαρμογών για τον καρκίνο, τη βελτίωση των παθολογικών ανοσολογικών αποκρίσεων (π.χ. αυτοανοσία) και άλλων εφαρμογών.

Τα εξωσώματα είναι νανομεγέθη κυστίδια φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Τα εξωσώματα από διάφορους ιστούς ή κύτταρα μελετώνται και υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα των εξωσωμάτων του γάλακτος λόγω του αναδυόμενου ρόλου τους ως αγγελιοφόροι μεταξύ των κυττάρων και του γεγονότος ότι μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες με πλούσια πηγή το γάλα. Τα εξωσώματα γάλακτος έχουν διαχωριστεί επιτυχώς από το πρωτόγαλα και το γάλα βοοειδών, το γάλα χοίρων, το γάλα αρουραίων, το γάλα κατσίκας και το ανθρώπινο μητρικό γάλα. Η δομή της μεμβράνης του εξωσώματος είναι ζωτικής σημασίας καθώς επιτρέπει στα miRNA εντός των εξωσωμάτων να αποφύγουν την αποικοδόμηση στο γαστρεντερικό σύστημα και να απορροφηθούν περαιτέρω στο έντερο. Η εφαρμογή των εξωσωμάτων που προέρχονται από το γάλα, είναι πολύ ενδιαφέρουσα και διερευνώνται ως νανοεπινοήσεις και αντίστοιχες εφαρμογές για την ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών / χημειοπροληπτικών φορέων (Xin, Xiaolin, Xucan, Hui, Qien, Shen, Huihua, & Jianwei, 2021).

Είθε τα επόμενα χρόνια να φέρουν ακόμη περισσότερες προόδους!

1.2.1 Υγρή βιοψία

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στο πεδίο των εξωσωμάτων έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αξιοποίηση του φορτίου τους (πρωτεΐνες, mRNA και miRNAs) ως βιοδείκτες σε τεχνικές υγρής βιοψίας επιτρέποντας την διάγνωση και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου του καρκίνου του πνεύμονα. Καθώς μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί η αποτελεσματικότερη τεχνική που θα εμφανίζει ικανοποιητική καθαρότητα, εξετάστηκε ένα εύρος τεχνικών για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές.

Τα εξωσώματα έχουν αποκτήσει σημασία σε πολλούς τομείς. Για τους σκοπούς όμως της παρούσας μελέτης θα περιοριστούμε και θα επικεντρωθούμε σε μερικά αξιοσημείωτα θέματα όπως την ανοσολογία και τη διακυτταρική επικοινωνία.

Η ικανότητα των εξωσωμάτων να διεγείρουν άμεσα τα αφελή T κύτταρα μπορεί να περιορίζεται στα εξωσώματα από δενδριτικά κύτταρα που έχουν λάβει μια ωρίμανση (Segura et al., 2005). Η ικανότητα των εξωσωμάτων να διεγείρουν κυτταρικές αποκρίσεις δημιούργησε ενδιαφέρον για τις δυνατότητες των εξωσωμάτων στην ανοσοποίηση, ιδίως στην ανοσολογία του τομέα των όγκων, αλλά η πρακτική εφαρμογή των εξωσωμάτων για ανοσοποίηση ή ανοσία των όγκων έχει υψηλό ενδιαφέρον. Εκτός από την ικανότητά τους να επηρεάζουν την προσαρμοστική ανοσία φέροντας σύμπλοκα πεπτιδίων-MHC ή αντιγόνα που μπορούν να επεξεργαστούν από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για παρουσίαση σε T κύτταρα, τα εξωσώματα μπορεί επίσης να φέρουν μόρια που διεγείρουν έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Τι θα φέρει το μέλλον στον τομέα της έρευνας των εξωσωμάτων; Εκτός από τη σημασία τους για τους θεμελιώδεις μηχανισμούς διακυτταρικής επικοινωνίας, σηματοδότησης και ρύθμισης, τα εξωσώματα και άλλα εξωκυτταρικά κυστίδια μπορεί να έχουν σημαντικές κλινικές εφαρμογές στο μέλλον (Raposo and Stoorvogel, 2013).

1.3 Σκοπός & στόχοι μελέτης

Με βάση τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας μελέτης εστιάζει στην επιτυχημένη διαδικασία απομόνωσης εξωσωμάτων από το γάλα μέσω επίσης επιτυχούς επιλογής και εφαρμογής κατάλληλων τεχνικών προκειμένου τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν να συνεισφέρουν στην ανάλυση του περιεχομένου του. Απώτερος στόχος είναι ο εμπλουτισμός των εξωσωμάτων με επιλεγμένους παράγοντες και τη μεταφορά τους μέσω αυτών σε κατάλληλα κύτταρα-στόχους.

Στόχοι μελέτης

Όσον αφορά στους στόχους της συγκεκριμένης μελέτης αυτοί περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Εξέταση της βιολογίας, της λειτουργίας και των βιοϊατρικών εφαρμογών των εξωσωμάτων
- Ενδοσκοπήση στον φυσιολογικό σκοπό της δημιουργίας των εξωσωμάτων
- Εξέταση παραμέτρων σκοπιμότητας απομόνωσης των εξωσωμάτων
- Εξέταση φάσματος τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων από υγρά και συγκεκριμένα από το γάλα τριών κατηγοριών μηρυκαστικών : προβάτου, γίδας και αγελάδας.
- Επιλογή αντίστοιχης τεχνικής/τεχνικών και παρουσίαση της λογικής που υπογράμμισε αυτή την επιλογή
- Εντοπισμός και παρουσίαση κριτηρίων επιτυχούς διαδικασίας απομόνωσης
- Προτάσεις για περαιτέρω βελτιώσεις στην διαδικασία και τις τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων με έμφαση στο γάλα

1.4 Περίγραμμα κεφαλαίων μελέτης

Τα κύρια κεφάλαια της παρούσας μελέτης έχουν σχεδιαστεί κατά τρόπον ώστε να παρέχουν τις απαραίτητες δευτερογενείς πληροφορίες προκειμένου να διεξαχθεί η μεθοδολογία από την οποία θα προκύψουν τα πρωτογενή στοιχεία απαραίτητα για την ικανοποίηση του σκοπού και των στόχων της μελέτης.

Στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, το οποίο είναι το πρώτο της μελέτης, παρουσιάζονται και οριοθετούνται το πλαίσιο και το πεδίο διεξαγωγής της μελέτης. Στη συνέχεια, ορίζονται ο σκοπός, οι στόχοι που επιδιώκει να ικανοποιήσει η παρούσα μελέτη αντίστοιχα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, αυτό της Βιβλιογραφικής Ανασκόπησης, παρουσιάζονται και αναλύονται τα θεωρητικά "εργαλεία" (πλαίσια, έννοιες, θεωρίες κ.λπ.) που θα εφαρμοστούν αφενός για το σχεδιασμό του ερευνητικού εργαλείου και αφετέρου για την ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της πρωτογενούς έρευνας, ώστε να προκύψουν ρεαλιστικά και αξιόπιστα αποτελέσματα επί των οποίων θα προταθούν προσεγγίσεις για βελτιωτικές και αναπτυξιακές δράσεις βάσει σημαντικών εννοιών και σχετικών τεχνικών. Αυτές περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές απομόνωσης και ανίχνευσης των εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στην υπερφυγοκέντρωση, την κατακρήμνιση καθώς και τον συνδυασμό αυτών. Τονίζεται επίσης η σπουδαιότητα της διαδικασίας του προκαταρκτικού καθαρισμού πριν την εφαρμογή των τεχνικών απομόνωσης κι εξηγείται η προσέγγιση εφαρμογής της.

Στο τρίτο κεφάλαιο αυτό της Μεθοδολογίας διερευνάται το πλαίσιο στο οποίο εντάσσεται η έρευνα, οι μεθοδολογικές τεχνικές που επιλέχθηκαν προς εφαρμογή παρουσιάζοντας και την λογική που υπογράμμισε τη συγκεκριμένη επιλογή. Επίσης παρουσιάζονται απαραίτητες προκαταρκτικές διαδικασίες και στη συνέχεια συζητάτε και παρουσιάζεται ο τρόπος της εφαρμογής των τεχνικών απομόνωσης των εξωσωμάτων απ' το γάλα καθώς και τα υλικά και τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή των τεχνικών απομόνωσης. Τέλος, αποφασίζονται και καθιερώνονται τα κριτήρια με βάση τα οποία θα κριθεί η επιτυχία της διαδικασίας απομόνωσης.

Στο τέταρτο και τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την διαδικασία απομόνωσης των εξωσωμάτων του γάλακτος και με βάση τα κριτήρια που έχουν τεθεί αξιολογείται και κρίνεται ο βαθμός επιτυχίας της διαδικασίας απομόνωσης των εξωσωμάτων υπό εξέταση.

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Δ Ε Υ Τ Ε Ρ Ο

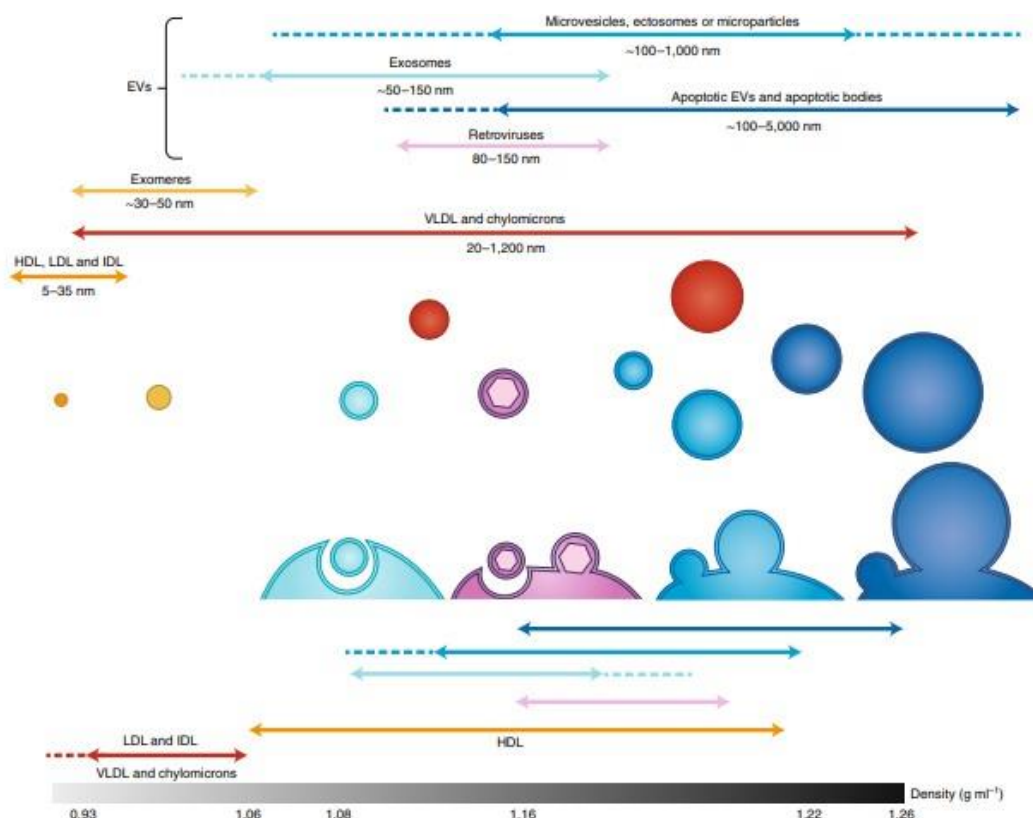
2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Εξωσώματα

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων πραγματοποιείται με την ύπαρξη των εξωσωμάτων, τα οποία φαίνεται να έχουν καθοριστικό ρόλο. Παράγονται από σχεδόν όλα τα είδη κυττάρων και βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά όπως αίμα, ούρα, υπεζωκοτικό υγρό, σπέρμα, γάλα, υγρό μεγάλης κοιλίας μηρυκαστικών καθώς και σε χυμούς φρούτων και λαχανικών. Δημιουργούνται ύστερα από με σύντηξη των πολυκιστιδιακών σωματιδίων με τη πλασματική μεμβράνη. Ως εξωσώματα θεωρούνται εξωκυτταρικά νανοσωματίδια μεγέθους 30 - 150 nm, τα οποία έχουν πυκνότητα από 1,13 έως 1,19 g/ml. Βάση της μορφολογίας τους χαρακτηρίζονται ως πεπλατυσμένες σφαίρες με κυπελλοειδή σχήμα. Η εξωτερική τους μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια και πρωτεΐνες, καθώς το περιεχόμενό τους αποτελείται από πληθώρα βιομορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, και διάφορα νουκλεϊκά οξέα όπως microRNA, lncRNA και mRNA. Βάση του περιεχομένου τους δεδομένου ότι διατηρούν τη βιολογική τους δράση, τα εξωσώματα επηρεάζουν τα κύτταρα δέκτες παρέχοντας σε αυτά την πληροφορία των προγονικών τους κυττάρων. (Javaria Munir, 2020). Οι πρωτεϊνικοί μάρτυρες οι οποίοι τα χαρακτηρίζουν ποικίλουν, λόγω τις διαφορετικής προέλευσης τους και της μεθόδου απομόνωσής τους. Παρόλα ταύτα υπάρχουν κάποιες πρωτεΐνες που σηματοδοτούν την ύπαρξη εξωσωμάτων. (Farrukh Aqila, 2019).

2.1.1 Ονοματολογία & ταξινόμηση εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs)

Με τον γενικευμένο όρο εξωκυτταρικά σωματίδια η εξωκυτταρικά κυστίδια θεωρούνται διάφορα σωματίδια, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα ως μεμβρανικές δομές. (Rienk Nieuwland, 2022) Αρχικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα εκτοσώματα και τα εξωσώματα. Εκτοσώματα ονομάζονται τα σωματίδια τα οποία δημιουργούνται με την άμεση εκβλάστηση του πλάσματος προς τα έξω, όπως μικροκυστίδια, μικροσωματίδια και μεγάλα κυστίδια με εύρος από 50nm έως 1mm. Εξωσώματα ονομάζονται εκείνα τα οποία έχουν ενδοσωμική προέλευση και μέγεθος από 30 – 150 nm. (Raghu Kalluri, 2020)



Εικόνα 1. Φυσιολογικά χαρακτηριστικά υποτύπων εξωκυτταρικών κυστιδίων. (Mathilde Mathieu, Lorena Martin-Jaular, Grégory Lavieu & Clotilde Théry, 'pecificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication', *Nature Cell Biology* 21, 9-17, 2019)

Μια άλλη μορφή εκκρινόμενων σωματιδίων περιλαμβάνει τα αποπτωτικά σώματα. Τα τελευταία προκύπτουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και έχουν διάμετρο έως 5.000 nm (Crescitelli et al, 2013). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένας νέος πληθυσμός νανοσωματιδίων με διάμετρο περίπου 35 nm, ο οποίος διαφέρει σε μέγεθος και

περιεχόμενο από άλλα αναφερόμενα EVs. Τα νανοσωματίδια αυτά ονομάστηκαν εξωμερή (exomeres) (Zhang et al., 2018).

2.2 Βιογένεση των EVs και λειτουργία των εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα παράγονται σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει διπλή εισβολή της πλασματικής μεμβράνης και σχηματισμό ενδοκυτταρικών πολυκυτταρικών σωμάτων ((Multi Vesicle Bodies, MVB) που περιέχουν ενδοκυτταρικά κυστίδια (intraluminal vesicles ILVs). Τα ILVs τελικά εκκρίνονται ως εξωσώματα με εύρος μεγέθους από ~40 έως 160 nm σε διάμετρο μέσω της σύντηξης των MVB με την πλασματική μεμβράνη και της εξωκυττάρωσης.

Η πρώτη εισχώρηση του πλάσματος μεμβράνης σχηματίζει μια δομή σε σχήμα κυπέλλου που περιλαμβάνει πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας και διαλυτές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το εξωκυτταρικό περιβάλλον

Αυτό οδηγεί στον *de novo* σχηματισμό των ενός πρώιμου ενδοσώματος διαλογής (ESE) και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να συγχωνευθεί άμεσα με ένα προϋπάρχον ESE. Το δίκτυο trans-Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο μπορούν επίσης να συμβάλουν στο σχηματισμό και το περιεχόμενο του ESE (2, 4-6,13,14). ESEs μπορούν να ωριμάσουν σε ενδοσώματα όψιμης διαλογής (LSE) και τελικά να δημιουργήσουν MVBs, τα οποία επίσης ονομάζονται πολυκυψελιδικά ενδοσώματα. Τα MVBs σχηματίζουν με εισερχόμενη εισβολή της οριακής μεμβράνης των ενδοσωμάτων (δηλαδή, διπλή εισβολή της μεμβράνης του πλάσματος). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα σε MVBs που περιέχουν πολλά ILVs (μελλοντικά εξωσώματα). Το MVB μπορεί είτε να συγχωνευθεί με λυσοσώματα ή αυτοφαγοσώματα για να αποικοδομηθεί είτε να συγχωνευθεί με την πλασματική μεμβράνη για να απελευθερώσει το περιεχόμενα ILVs ως εξωσώματα (3, 4).

Τα εξωσώματα σχετίζονται με τις ανοσολογικές αποκρίσεις, την παθογένεια των ιών, την εγκυμοσύνη, τις καρδιαγγειακές παθήσεις, το κεντρικό νευρικό σύστημα και την εξέλιξη του καρκίνου. Οι πρωτεΐνες, οι μεταβολίτες και τα νουκλεϊκά οξέα που

παραδίδονται από τα εξωσώματα στα κύτταρα-δέκτες μεταβάλλουν αποτελεσματικά τη βιολογική τους απόκριση. Τέτοιες αποκρίσεις με τη μεσολάβηση εξωσωμάτων μπορεί να είναι προαγωγικές ή περιοριστικές της νόσου. Οι εγγενείς ιδιότητες των εξωσωμάτων στη ρύθμιση πολύπλοκων ενδοκυτταρικών μονοπατιών έχει προωθήσει τις δυνατότητές τους σε χρησιμότητα στον θεραπευτικό έλεγχο πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών καταστάσεων και του καρκίνου. Τα εξωσώματα μπορούν να κατασκευαστούν για να παραδώσουν ποικίλα θεραπευτικά φορτία, όπως μικρά παρεμβατικά RNAs, χημειοθεραπευτική ηλικία, διαμορφωτές του ανοσοποιητικού συστήματος, με δυνατότητα άμεσης χορήγησής τους σε έναν επιθυμητό στόχο. Η σύνθεση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών των εξωσωμάτων μπορεί να επηρεάσει τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και τα φυσικά συστατικά τους μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στην ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας και στην ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Εκτός από τις θεραπευτικές τους δυνατότητες, τα εξωσώματα έχουν επίσης τη δυνατότητα να βοηθήσουν στη διάγνωση ασθενειών. Έχουν αναφερθεί σε όλα τα βιολογικά υγρά και η σύνθεση του συμπλέγματος φορτίου των εξωσωμάτων είναι εύκολα προσβάσιμη μέσω της δειγματοληψίας βιολογικών υγρών (υγρές βιοψίες). Υγρή βιοψία με βάση τα εξωσώματα αναδεικνύει τη δυνητική χρησιμότητά τους στη διάγνωση και τον προσδιορισμό της πρόγνωσης ασθενών με καρκίνο και άλλες ασθένειες. Η εξέλιξη της νόσου και η ανταπόκριση στη θεραπεία μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με μια πολυπαραγοντική ανάλυση των εξωσωμάτων (Cahlert & Calluri., 2013).

Η ανθρώπινη αναπαραγωγή, η εγκυμοσύνη και η εμβρυϊκή ανάπτυξη απαιτούν ακριβείς, λεπτές ρυθμίσεις, και δυναμική διακυτταρική επικοινωνία.

2.3 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά

Σπέρμα, αμνιακό υγρό, αίμα και μητρικό γάλα όλα περιέχουν εξωσώματα με σχετικές λειτουργίες. Το μοριακό προφίλ υποδεικνύει ότι τα microRNAs , miR148a, miR-375 και miR-99a εμπλουτίζονται σε Εξωσώματα που προέρχονται από πλάσμα από πολλαπλούς ανθρώπινους δότες . Αυτά τα miRNAs εμπλέκονται στην έκφραση των ιντερλευκινών (IL-10 και IL-13) αύξηση της πιθανότητας τα εξωσώματα να παίζουν ρόλο στην ανοσία των κατοίκων των γεννητικών οργάνων . Τα σπερματικά εξωσώματα που προέρχονται από πλάσμα αναστέλλουν επίσης HIV-1 λοίμωξη πιθανώς με

αποκλεισμό της πρωτεΐνης που ‘πυροδοτεί’ την ανάπτυξη του HIV (Welch, 2018). Στο μητρικό γάλα, τα εξωσώματα φαίνεται να προάγουν την υγεία και την ανάπτυξη μετά τη γέννηση. Το μητρικό γάλα περιέχει miRNAs με λειτουργίες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και ενισχύουν τον αριθμό των T-ρυθμιστικών κυττάρων που προέρχονται από το περιφερικό αίμα, ενδεχομένως για τη ρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής(51). Αν και τα εξωσώματα που προέρχονται από το μητρικό γάλα έχει αποδειχθεί ότι προάγουν τον πολλαπλασιασμό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων του σε καλλιέργεια συνθήκες και του εντερικού σωλήνα, παραμένει ασαφές σε ποιο βαθμό, εάν υπάρχει, η μεταφορά νουκλεϊκών οξέων και άλλων εξωσωματικών φορτίων διατηρείται μετά την κατάποση, έχοντας να ξεπεράσουν τα πεπτικά ένζυμα κατά την πρόσληψη στο εντερικό επιθήλιο. Ο αντίκτυπος των διαφορετικών οδών χορήγησης στους ιστούς και πρόσληψης των εξωσωμάτων θα επηρεάσει τις πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές (Vojtech *et al.*, 2014).

Τα εξωσώματα βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά και εκκρίνονται από όλα τα κύτταρα, γεγονός που τα καθιστά ελκυστικά ως ελάχιστα επεμβατικές υγρές βιοψίες με δυνατότητα διαχρονικής δειγματοληψίας για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Η βιογένεση των εξωσωμάτων επιτρέπει τη σύλληψη ενός σύνθετου εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού μοριακού φορτίου για ολοκληρωμένες, πολυπαραμετρικές διαγνωστικές δοκιμές. Οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη των εξωσωμάτων διευκολύνουν επίσης την ανοσολογική αναγνώριση και τον εμπλουτισμό τους. Οι ασθένειες που έχουν βρεθεί στο επίκεντρο της διαγνωστικής εφαρμογής των εξωσωμάτων με λήψη βιολογικών υγρών περιλαμβάνουν κυρίως τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τις ασθένειες που επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (180) και τον καρκίνο χωρίς να αγνοούμε την εφαρμογή τους στον καθορισμό του εμβρυακού φύλου αφού βρίσκονται και στο αμνιακό υγρό. Η προσπάθεια αυτή επεκτείνεται με ταχείς ρυθμούς και σε άλλες νόσους που αφορούν το ήπαρ, νεφρά και τους πνεύμονες.

2.4 Θρεπτικά χαρακτηριστικά γάλακτος μηρυκαστικών (Υδατάνθρακες, Πρωτεΐνες, Λίπος, Βιταμίνες & Ένζυμα)

Το γάλα περιέχει βασικά θρεπτικά συστατικά όπως νερό, λίπη, πρωτεΐνες, λακτόζη και ιχνοστοιχεία. Οι αναλογίες διαφέρουν, ανάλογα με το είδος του ζώου, την ημέρα της γαλακτικής περιόδου καθώς επίσης και από γενετικούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες.(αναφορά). Στο γάλα βρίσκουμε τα κύρια και δευτερεύοντα στοιχεία. Τα κύρια είναι ποσοτικά περισσότερα και θρεπτικά σημαντικότερα, ενώ τα δευτερεύοντα προσδίδουν γεύση στο παραγόμενο προϊόν. Η λακτόζη είναι ένας χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος και αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Το λίπος του γάλακτος αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από τριγλυκερίδια και άλλα λιπίδια, όπου συνθέτουν ένα περίπλοκο μείγμα. Η σύνθεση των λιπαρών οξέων διαφέρει ανάλογα με την ημέρα της γαλακτοπαραγωγής. Επιπλέον οι πρωτεΐνες του χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού. Αναλογικά τα $\frac{3}{4}$ των πρωτεϊνών του γάλακτος αποτελούνται από καζεΐνη, όπου συναντώνται τέσσερα διαφορετικά ήδη S1,S2, γ και κ- καζεΐνη. Οι υπόλοιπες είναι πρωτεΐνες ορού με κυριότερη τη λακτοσφαιρίνη και πλήθος δευτερευόντων πρωτεϊνών και ενζύμων. Τα μέταλλα που συναντάται είναι κυρίως K, Na, Mg, Cl και φωσφορικά άλατα. Το γάλα των μηρυκαστικών περιέχει περισσότερες πρωτεΐνες και λίπη συγκριτικά με το ανθρώπινο γάλα.

Γάλα				
Πλάσμα				
Κύρια συστατικά	Λίπος	Καζεΐνη, νερό Άλατα	Ορός	
			Πρωτεΐνες ορού	Λίπη, πρωτεΐνες
Περιεκτικότητα (% της ΞΟ)	4	2,8	0,6	0,01
Διάμετρος σωματιδίων	0,05	0,1	0,006	10^{-4}
Αριθμός /λίτρο	10^{10}	10^{11}	10^{12}	10^{14}
Πυκνότητα (20 °C/ kg/ m ⁻³)	920	1100	1300	1100
Ορατά με ...	Μικροσκόπιο	Υπερμικροσκόπιο		Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
Διαχωρίζονται με	Διαχωριστή γάλακτος	Υψηλής ταχύτητας φυγοκέντρωση	Υπερ φιλτράρισμα	Υπερ φιλτράρισμα
Ισοηλεκτρικό pH	- 3,8	- 4,6	4-5	- 4

2.4.1 Υδατάνθρακες

Η λακτόζη είναι το βασικό σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών με εξαίρεση το γάλα ορισμένων θαλάσσιων θηλαστικών. Η σύνθεσή της πραγματοποιείται στο στα κυστίδια Golgi των κυττάρων του μαστού. Πέραν του γάλακτος δεν συναντάται σε άλλου στη φύση σε επιλήψιμα ποσά. Στο νοπό γάλα συναντούμε την ένυδρη α λακτόζη και την ένυδρη β λακτόζη. Πέραν της λακτόζης συναντούμε σε μικροποσότητες ολιγοσακχαρίτες καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα με πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Η λακτόζη μπορεί να διαχωριστεί από το γάλα ή, στη βιομηχανική πρακτική, από τον ορό γάλακτος, αφήνοντάς την να κρυσταλλώσει. Η κρυσταλλική λακτόζη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα και σε φαρμακευτικά προϊόντα. σχεδόν όλα τα χάρπια περιέχουν λακτόζη καθώς ένα υλικό πλήρωσης. Η λακτόζη χρησιμοποιείται επίσης ως πρώτη ύλη για μια σειρά χημικών και ολιγοσακχαρίτες.

2.4.2 Λίπος

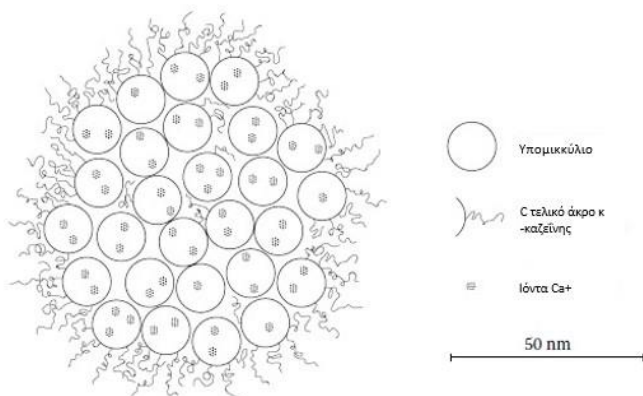
Το λίπος στο γάλα βρίσκεται σε μορφή λιποσφαιρίων. Τα περισσότερα να έχουν διάμετρο από 1 έως 5 μm και πυκνότητα 0,94 g/ml έως 0,88g/ml σε θ 20°C - 80° C. Το μεγαλύτερο μέρος αποτελείται από τριγλυκερίδια , δεν παύουν να υπάρχουν πάραυτα μόνο και διγλυκερίδια, όπως και από άλλες ενώσεις . Το 85 % τ ου λίπους αποτελείται από λιπαρά οξέα, εκ των οποίων βρίσκονται μονής, διπλής και πολλαπλής αλύσεως. Από τα κυριότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι το βουτυρικό, το λαυρικό, το παλμιτικό και το στεατικό και ακόρεστα το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λενολενικό.

2.4.3 Πρωτεΐνες

Οι βασικότερες πρωτεΐνες στο γάλα είναι οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Οι οποίες έχουν υποκατηγορίες. Οι καζεΐνες αποτελούν το 75 – 80% του γάλακτος και καθιζάνουν ύστερα από όξυνση σε pH 4,6 σε θ 20° C και ανάλογα με τη διάταξη των αμινοξέων τους χωρίζονται σε as1 καζεΐνη, as2 καζεΐνη, κ- καζεΐνη και β – καζεΐνη. Η πολυπληθέστερη είναι η as1 καζεΐνη. Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος είναι αυτές οι οποίες παραμένουν στον ορό ύστερα

από κατακρήμνιση των καζεϊνών και είναι οι εξής : οροαλβουμίνη, α-γαλακταλβουμίνη, β – γαλακταλβουμίνη και ανοσοσφαιρίνες.

Η μορφή η οποία βρίσκεται η καζεΐνη στο γάλα είναι σε σύμπλοκα, τα οποία ονομάζονται μικκύλια καζεΐνης. Μέσα στο γάλα τα μικκύλια είναι ισχυρώς ενυδατωμένα και αποτελούνται 93 % από καζεΐνες και το υπόλοιπο από ανόργανα στοιχεία. Η $\alpha s1$ καζεΐνη συναντάται με το ασβέστιο, η $\alpha s2$ καζεΐνη με το μαγνήσιο, η κ - καζεΐνη με ανόργανο φώσφορο και αντίστοιχα η β – καζεΐνη με νάτριο και κάλιο. Τα μικκύλια έχουν σφαιρικό σχήμα και αποτελούνται από μικρότερες μονάδες τα υπομικκύλια με μέγεθος 8 -20 μm . Το μέγεθος του μικκυλίου ποικίλει από 10 – 780 μm . Έχουν υδρόφοβο πυρήνα με αs και β – καζεΐνη και υδρόφιλη επιφάνεια με κυρίως κ – καζεΐνη. (Μαντης,2011, Debashree,2020) Η καζεΐνη που έχει μελετηθεί ενδελεχώς είναι εκείνη των αγελάδων. Καζεΐνες άλλων ειδών διαφέρουν στο μέγεθος και την συγκράτηση ιόντων με το μικρότερο μέγεθος να έχει το ανθρώπινο γάλα.(Debashree,2020)



Στο γάλα περιέχονται σχεδόν όλες οι βιταμίνες, κάποιες από αυτές σε ικανοποιητική ποσότητα και άλλες σε ίχνη. Από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες βρίσκονται η K σε ίχνη, καθώς και η βιταμίνη A ως εστέρας του παλμιτικού οξέος, η D και η E ως α-τοκοφερόλη. Από τις υδατοδιαλυτές υπάρχουν όλες του συμπλέγματος B, ανεξαρτήτου διακυμάνσεως της τροφής. Επίσης έχει αποδειχτεί πως περιέχονται κάποια απαραίτητοι παράγοντες ανάπτυξης όπως η καρνιτίνη και η χολίνη.(Μάντης, 2011)

Τα ένζυμα τα οποία ανευρίσκονται στο γάλα προέρχονται είτε από το αίμα του θηλαστικού, είτε από τα κύτταρα του μαστού, είτε από τα μικροοργανισμούς και ως

αποτέλεσμα της λύσης αυτών.(Dairy 2nd) Μερικά από αυτά είναι οι λιπάσες, η αλκαλική φωσφατάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση, οι πρωτεάσες, η ξανθίνη οξειδάση και η λυσοζύμη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης και του λίπους είναι μεγαλύτερη στα μηρυκαστικά από ότι στο ανθρώπινο γάλα.

2.5 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά – γάλα

Σπέρμα, αμνιακό υγρό, αίμα και μητρικό γάλα όλα περιέχουν εξωσώματα με σχετικές λειτουργίες. Το μοριακό προφίλ υποδεικνύει ότι τα microRNAs, miR148a, miR-375 και miR-99a εμπλουτίζονται σε Εξωσώματα που προέρχονται από πλάσμα από πολλαπλούς ανθρώπινους δότες. Αυτά τα miRNAs εμπλέκονται στην έκφραση των ιντερλευκινών (IL-10 και IL-13) αύξηση της πιθανότητας τα εξωσώματα να παίζουν ρόλο στην ανοσία των κατοίκων των γεννητικών οργάνων. Τα σπερματικά εξωσώματα που προέρχονται από πλάσμα αναστέλλουν επίσης HIV-1 λοίμωξη πιθανώς με αποκλεισμό της πρωτεΐνης που 'πυροδοτεί' την ανάπτυξη του HIV (Welch, 2018). Στο μητρικό γάλα, τα εξωσώματα φαίνεται να προάγουν την υγεία και την ανάπτυξη μετά τη γέννηση. Το μητρικό γάλα περιέχει miRNAs με λειτουργίες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και ενισχύουν τον αριθμό των T-ρυθμιστικών κυττάρων που προέρχονται από το περιφερικό αίμα, ενδεχομένως για τη ρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής(51). Αν και τα εξωσώματα που προέρχονται από το μητρικό γάλα έχει αποδειχθεί ότι προάγουν τον πολλαπλασιασμό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων του σε καλλιέργεια συνθήκες και του εντερικού σωλήνα, παραμένει ασαφές σε ποιο βαθμό, εάν υπάρχει, η μεταφορά νουκλεϊκών οξέων και άλλων εξωσωματικών φορτίων διατηρείται μετά την κατάποση, έχοντας να ξεπεράσουν τα πεπτικά ένζυμα κατά την πρόσληψη στο εντερικό επιθήλιο. Ο αντίκτυπος των διαφορετικών οδών χορήγησης στους ιστούς και πρόσληψης των εξωσωμάτων θα επηρεάσει τις πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές (Vojtech *et al.*, 2014).

Τα εξωσώματα βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά και εκκρίνονται από όλα τα κύτταρα, γεγονός που τα καθιστά ελκυστικά ως ελάχιστα επεμβατικές υγρές βιοψίες με δυνατότητα διαχρονικής δειγματοληψίας για την παρακολούθηση της εξέλιξης της

νόσου. Η βιογένεση των εξωσωμάτων επιτρέπει τη σύλληψη ενός σύνθετου εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού μοριακού φορτίου για ολοκληρωμένες, πολυπαραμετρικές διαγνωστικές δοκιμές. Οι επιφανειακές πρωτεΐνες στα εξωσώματα διευκολύνουν επίσης την ανοσολογική σύλληψη και τον εμπλουτισμό τους. Οι ασθένειες που έχουν βρεθεί στο επίκεντρο της διαγνωστικής εφαρμογής των εξωσωμάτων με λήψη βιολογικών υγρών περιλαμβάνουν κυρίως τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τις ασθένειες που επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (180) και τον καρκίνο χωρίς να αγνοούμε την εφαρμογή τους στον καθορισμό του εμβρυακού φύλου αφού βρίσκονται και στο αμνιακό υγρό. Η προσπάθεια αυτή επεκτείνεται με ταχείς ρυθμούς και σε άλλες νόσους που αφορούν το ήπαρ, νεφρά και τους πνεύμονες.

2.5.1 Εξωσώματα στο γάλα

Εξωσώματα από γάλα καθώς και από πρωτόγαλα έχουν εξίσου επιτυχώς απομονωθεί από διάφορα θηλαστικά όπως από βοοειδή, χοιρομητέρες, ποντίκια, αίγες, καγκουρό και από άνθρωπο. Ο τρόπος που είναι δομημένη η εξωτερική τους στοιβάδα τα καθιστά τόσο ιδιαίτερα και ξεχωριστά, καθώς είναι ζωτικής σημασίας για να επιτευχθεί ο σκοπός τους και να μεταφερθεί το εσωτερικό τους φορτίο. Λόγω της ιδιαίτερης λιπιδιακής τους διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων είναι σταθερά ως προς τη δομή και το μέγεθος, αποθηκεύοντάς τα στους -80°C . Επίσης η ιδιαίτερη μεμβράνη τους, επιτρέπει στα miRNA μέσα στα εξωσώματα να αποφεύγουν την αποικοδόμηση στη γαστρεντερική οδό και να απορροφούνται περαιτέρω στο έντερο. Όπως και με τα εξωσώματα που απομονώνονται από άλλα υγρά, τα εξωσώματα του γάλακτος περιέχουν στοιχεία από τα προγονικά τους κύτταρα όπως λιπίδια, microRNA, πρωτεΐνες, mRNA και DNA. Τα εξωσωματικά φορτία ταξινομούνται σε μια ρυθμιζόμενη, μη τυχαία διαδικασία και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην επικοινωνία από κύτταρο σε κύτταρο. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, η ανάλυση μικροσυστοιχίας έδειξε ότι τα περισσότερα mRNA του γάλακτος υπήρχαν στα εξωσώματα. Οι Admyre et al ανέφεραν ότι το ριβοσωμικό RNA (18S και 28S) είναι πολύ χαμηλό σε MDE ανθρώπινου μαστού. Η παρουσία εξωσωματικών mRNAs όπως CD63, CD36, Ea1, FAS, MFG-E8, MHC-II επιβεβαιώθηκε και στα δύο γάλατα. (Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC, 2016) Βασικό χαρακτηριστικό των εξωσωμάτων που προέρχονται από γάλα, είναι η σταθερότητα. Τα φορτία τα οποία είναι ενθυλακωμένα σε αυτά, προστατεύονται από ενζυμική και μη ενζυμική

αποικοδόμηση. Σε πρόσφατες μελέτες έχουν ανιχνευθεί miRNA και mRNA σε σημαντικές ποσότητες στο γάλα, αντίθετα όμως η συγκέντρωση RNAase ήταν εξίσου εξαιρετικά υψηλή. Τα miRNA στα εξωσώματα γάλακτος του μαστού εξακολουθούν να είναι υψηλά μετά από θεραπείες RNase, ψύξη-απόψυξη και όξινες (pH = 1) , επιτρέποντας έτσι τη διατροφική πρόσληψη miRNA από τα βρέφη. (Xin Feng et al, 2021)

Με βάση τα παραπάνω, στόχος της εργασίας αποτελεί η απομόνωση καταρχήν εξωσωμάτων από γάλατα διαφορετικών ζώων. Τα εξωσώματα, μετά την επιβεβαίωση της απομόνωσης θα χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες. Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι η δημιουργία τοπολογικών δικτύων φυλογενετικής απόστασης μεταξύ των ανθρώπινων βιοπολυμερών. Η προτεινόμενη πολυδιάστατη ανάλυση βιοπληροφορικής θα δείξει ποιο ζωικό γάλα έχει την υψηλότερη φυλογενετική συγγένεια με το ανθρώπινο γάλα με βάση συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων και, συνεπώς, την υψηλότερη θρεπτική αξία για τα νεογνά. Θα συμπεριληφθεί η εφαρμογή τεχνικών υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση mRNA, μη κωδικοποιητικών RNA, πρωτεϊνών και μικρών μορίων που δεσμεύονται ή ενθυλακώνονται σε εκκρινόμενες λιπιδικές μεμβράνες (εξωσώματα).

2.6 Τεχνικές απομόνωσης εξωκυττάρων κυστιδίων

2.6.1 Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (Polyethylene glycol)

Η διαδικασία της απομόνωσης των εξωσωμάτων μέσω κατακρήμνισης και μέσω χρήσης πολυμερών μορίων συνιστά μια συχνά εφαρμοζόμενη μέθοδο απομόνωσης εξωσωμάτων η οποία βασίζεται στην διαδικασία αλληλεπίδρασης υδρόφιλων πολυμερών μορίων με μόρια ύδατος τα οποία με τη σειρά τους περιβάλλουν τα εξωσώματα.

Ανάμεσα σε ένα φάσμα διαφόρων υδρόφιλων πολυμερών, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) συνιστά ένα πολυμερές με δυνατότητα αναδιαμόρφωσης της υδατοδιαλυτότητας των περιβαλλόντων υλικών καθώς περικυκλώνει εκατοντάδες εξωσώματα μαζί, έχοντας ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται εξωσωματικά

συσσωματώματα, τα οποία στη συνέχεια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρωση χαμηλής ταχύτητας (Weng et al., 2016).

Προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των εξωσωμάτων με PEG είναι απαραίτητο να προηγηθεί ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού και προκειμένου να απομακρυνθούν σωματιδιακές προσμίξεις (κυτταρικά υπολείμματα) και μεγαλύτερων εξωκυτταρικών κυστιδίων (αποπτωτικά σώματα). Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η επώαση των δειγμάτων με το διάλυμα PEG στους 4 °C για τουλάχιστον 12 ώρες. Τέλος ακολουθεί η συλλογή των εξωσωμάτων μέσω μιας φυγοκεντρικής διαδικασίας χαμηλής ταχύτητας και η επαναδιαλυση τους σε διάλυμα PBS (Rider et al., 2016; Garcia-Romero et al., 2019).

Θα πρέπει όμως εδώ να σημειωθεί ότι τέτοια πολυμερή μόρια δύνανται να κατακρημνίζουν όχι μόνο εξωσώματα, αλλά και διάφορα υδατοδιαλυτά μόρια, όπως νουκλεϊκά οξέα, λιποπρωτεΐνες, πρωτεΐνες ακόμη και οι ιούς (Sim et al., 2012; Kimura et al., 2019). Ως εκ τούτου, η πιθανότητα ύπαρξης άλλων εξωκυτταρικών προσμίξεων θα μπορούσε να είναι αρκετά υψηλή. Όντως, η εξέταση των εξωσωματικών δειγμάτων τα οποία και προκύπτουν από την συγκεκριμένη τεχνική, παρέχουν αποδείξεις ότι περιέχουν πρωτεϊνικές προσμίξεις, όπως αλβουμίνη και ανοσοσφαιρίνες και οι οποίες προσμίξεις ακολουθούνται από υπολείμματα του πολυμερούς μορίου (Kalra et al., 2013).

2.6.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση

Ο βαθμός επιτυχούς εφαρμογής απομόνωσης εξωκυτταρικών κυστιδίων η αλλιώς εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση είναι πολύ-παραγοντικός καθώς εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως η επιτάχυνση (g), ο τύπος της κεφαλής, τα χαρακτηριστικά της (συντελεστής k, ακτίνα περιστροφής και μήκος διαδρομής καθίζησης) (Cvjetkovic et al., 2014; Livshits et al., 2015), όπως επίσης και από το ιξώδες του αρχικού δείγματος για την απομόνωση των εξωσωμάτων (Thery et al., 2006). Είναι πολύ σημαντικό οι συγκεκριμένοι παράγοντες να λαμβάνονται υπ' όψη κατά την εφαρμογή ή την οποιασδήποτε ενίοτε τροποποίηση των πρωτοκόλλων υπερφυγοκέντρωσης, έτσι ώστε να λαμβάνονται εξωσώματα με τις λιγότερες δυνατές προσμίξεις πρωτεϊνών μη εξωσωματικής προέλευσης, και εξωκυτταρικά κυστίδια

μεγαλύτερου μεγέθους. Πολύ σημαντικό είναι επίσης το να λαμβάνεται υπ' όψη ο παράγοντας 'k' προκειμένου να επιτυγχάνεται όσο το δυνατόν πιο ακριβής εκτίμηση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της φυγοκέντρωσης ενός δείγματος (Cvjetkovic et al., 2014).

Σύμφωνα με τους Wilson και Walker (2010) στο ερευνητικό πεδίο των Extracellular vesicles (EVs) γίνεται χρήση δυο κύριων τύπων κεφαλών, αυτού της κεφαλής ταλαντευόμενου κάδου και του τύπου της κεφαλής σταθερής γωνίας. Όπως υποστηρίζουν οι Cvjetkovic κ.α. (2014) οι δυο αυτοί τύποι κεφαλών παρουσιάζουν διαφορά στη λειτουργία τους λόγω της θέσης τους κατά τη διάρκεια της φυγοκεντρικής διαδικασίας : συγκεκριμένα σε οριζόντια θέση βρίσκεται η κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου ενώ όπως δηλώνει κι ο όρος της σε σταθερή γωνία η κεφαλή σταθερής γωνίας.

Καθώς οι διαφορετικοί τύποι κεφαλών παρουσιάζουν διαφορετικό μήκος διαδρομής καθίζησης. Η ταχύτητα και ο χρόνος φυγοκέντρωσης θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με τον τύπο της χρησιμοποιούμενης κεφαλής.

Πάντως, όπως υποστηρίζουν οι Witner και συνεργάτες (2013) το βασικό πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι φυγοκέντρωση 70 λεπτών σε μια ταχύτητα 100.000 g. Ενώ συνήθως γίνεται χρήση των κεφαλών σταθερής γωνίας.

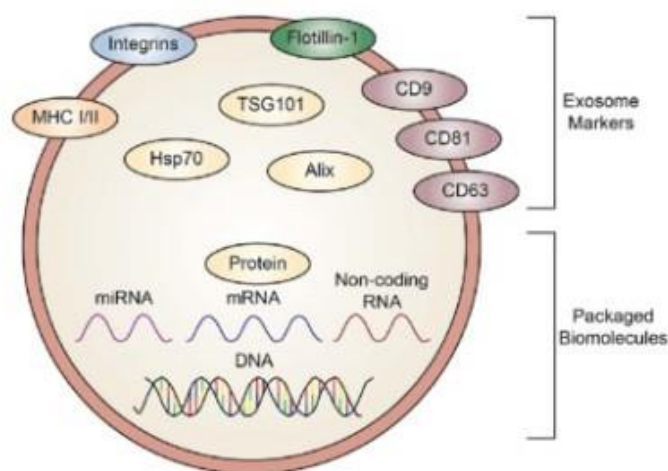
2.6.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με παρουσία σουκρόζης

Αν και η απομόνωση των εξωσωμάτων με φυγοκεντρικές και υπερφυγοκεντρικές προσεγγίσεις δίνουν καθαρά σχετικά εξωσώματα οι Gupta και συνεργάτες (2018) υποδεικνύουν την αναγκαιότητα συμπερίληψης ενός ακόμη σταδίου καθαρισμού (Thery et al., 2006) κάνοντας χρήση στιβάδας σουκρόζης. Έτσι αρχικά λαμβάνει χώρα μια φυγοκέντρωση με χρήση στιβάδας σουκρόζης κι έπεται μια υπερφυγοκέντρωση αποσκοπώντας στην απομάκρυνση μη εξωσωματικών πρωτεϊνών.

2.6.4 Πρωτεϊνικοί δείκτες εξωσωμάτων

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων είναι ο εντοπισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνών, που σηματοδοτούν την ύπαρξη τους στο εκάστοτε βιολογικό υγρό. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) έχουν επικρατήσει 100 διαφορετικές πρωτεΐνες, με τις

κυριότερες και πιο συχνές που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτόν να είναι οι Annexin, Alix, Flotillin, CD9, CD83, CD63, TSG101, HSP70, HSP90 και άλλες. Οι οποίες είτε βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των εξωσωμάτων, είτε εσωτερικά αυτών. (Fengyan Deng, 2019). Η τετρασπανίνη CD47 εικάζεται πως είναι βοηθά στην διατήρηση των εξωσωμάτων στο σώμα σε σύγκριση με τα λιποσωματίδια, λόγω της προστασίας που προσδίδει σε αυτά έναντι της φαγοκυττάρωσης από μακροφάγα και μονοκύτταρα. (Farrukh Aqila R. M.-H., 2019)



Εικόνα 2. Δείκτες εξωσωμάτων, Kathleen M. McAndrews* and Raghu Kalluri 'Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer', Molecular Cancer, 2019

2.7 Εμπλουτισμός εξωσωμάτων σε τροφές με έμφαση στο μητρικό γάλα

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες και τα αντιοξειδωτικά συστατικά αναμένεται να προλαμβάνουν ουσιαστικά τις ασθένειες και να συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας. Ωστόσο, τα αντιοξειδωτικά αποικοδομούνται εύκολα από ένζυμα πριν απορροφηθούν στο έντερο, οπότε είναι απαραίτητο ένα μέσο μεταφοράς που να αποτρέπει την αποικοδόμησή τους στο σώμα. Τα εξωσώματα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ μεμονωμένων κυττάρων, έχουν προσελκύσει την προσοχή ως νέος φορέας μεταφοράς miRNA και DNA, αλλά δεν έχουν ακόμη αξιοποιηθεί πλήρως στην έρευνα για τα τρόφιμα. Πιο πρόσφατα, τα εξωσώματα που εξάγονται από το γάλα βοοειδών άρχισαν

να χρησιμοποιούνται ευρέως ως οικονομικός αποδοτικός φορέας μεταφοράς όχι μόνο στην κλινική ιατρική αλλά και σε λειτουργικά υλικά τροφίμων.

Για να αναπτυχθούν πρακτικές εφαρμογές ως φορείς για λειτουργικά τρόφιμα, είναι απαραίτητες συστηματικές μελέτες για να αποσαφηνιστεί η αποτελεσματικότητα της εισαγωγής και οι ιδιότητες των ενθυλακωμένων ουσιών. Στην μελέτη των Onizuka , Fujita , Ide, Naito, και Kaji, (2023) με τίτλο Antioxidants encapsulated milk-derived exosomes for functional food development εφαρμόστηκε ηλεκτροδιάταξη και επώαση για την ενθυλάκωση αντιοξειδωτικών στα εξωσώματα και μελετήθηκε κι εντοπίστηκε η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης στα εξωσώματα και την αντικαρκινική δράση. Εξωσώματα γάλακτος χαρακτηρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την μεταφορά των αντιοξειδωτικών, καθιστώντας τα πιο κατάλληλα από τα λιπосώματα, που έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν , λόγω της σταθερότητάς τους στο αίμα. Τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι ασταξανθίνη, α-τοκοφερόλη, κουρκουμίνη, χλωρογενικό οξύ, β-καροτίνη, ρουτίνη και ρεσβερατρόλη. Από τα βασικά αποτελέσματα της μελέτης είναι, πως τα αντιοξειδωτικά με υψηλό συντελεστή κατανομής ενθυλακώθηκαν εύκολα σε εξωσώματα εκτός από την α-τοκοφερόλη. Το ενθυλακωμένο με β-καροτίνη εξώσωμα δεν έδειξε εμφανή αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά έδειξε μακροπρόθεσμη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με το γυμνό αντιοξειδωτικό. Στις μελέτες σταθερότητας διατήρησαν την αρχική ποιότητα για 3 εβδομάδες, αλλά μετά από 4 εβδομάδες, η συσσωμάτωση των εξωσωμάτων ήταν παρατηρήθηκε. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την πιθανή εφαρμογή των αντιοξειδωτικών-ενθυλακωμένων εξωσωμάτων ως εφαρμογή νέων συμπληρωματικών φαρμάκων ή λειτουργικών τροφίμων.

3 Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Τ Ρ Ι Τ Ο

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Υλικά και μέθοδοι

Σε συνεργασία με φάρμες της περιοχής της Αττικής συλλέχθηκαν δείγματα πρόβειου, αίγειου και αγελαδινού γάλακτος. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από την παγολεκάνη, είναι δηλαδή αποτέλεσμα συλλογής όλου του κοπαδιού που βρίσκεται στη γαλακτική περίοδο.

3.2 Προκαταρτικός καθαρισμός

Η διαδικασία του προκαταρτικού καθαρισμού ξεκινά με την κλασματοποίηση των δειγμάτων. Με την παραλαβή των δειγμάτων ακολουθείτε διαχωρισμός και αποθήκευση αυτών σε falcon, με χρήση ποσότητας γάλακτος 50ml, ικανοποιητική ποσότητα για την πραγμάτωση της τεχνικής. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την απομάκρυνση του λίπους, καθώς και της πολυπληθέστερης ποσοτικά πρωτεΐνης του γάλακτος των μηρυκαστικών, της καζεΐνης. Η αποθήκευσή τους γίνεται στους -80°C εωσότου πραγματοποιηθεί ο προκαταρτικός καθαρισμός τους. Έπειτα ακολουθήσαν το εξής βήματα:

Καθώς τα δείγματα βρίσκονται στο εργαστήριο, διατηρούνται πάντα σε πάγο

- Αραίωση δείγματος με 3 vol (3:1)
- Φυγοκέντριση στα 4000g/ 15' / 4°C
- Λήψη υπερκειμένου και αραίωση σε ίσο όγκο 0,25M EDTA, pH 7
- Επώαση για 15' καλυμμένα με πάγο
- Φυγοκέντριση στα 12.000g / 1h / 4°C
- Λήψη υπερκειμένου και
- Φυγοκέντριση σε 22.500g / 1h / 4°C
- Φιλτράρισμα με 0,22 μm PES
- Προσθήκη PEG 8000 kDa. 50% w/v (τελική συγκέντρωση 12% w/v)
- Επώαση O/N 4oC υπό ανάδευση (1500 rpm)
- Φυγοκέντριση 22500g/60' /4oC
- Επαναιώρηση ιζήματος σε 20 ml PBS
- Αποθήκευση δείγματος (προ-καθαρισμένου) σε -80oC

Ο προκαταρτικός καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε corex φιάλες, χωρητικότητας 500 ml. Η αραιώση του δείγματος ήταν σε αναλογία 3:1,3 μέρη PBS και 1 μέρος δείγματος, έτσι ώστε να μειωθεί το ιξώδες του υλικού που έχουμε προς ανάλυση. Έπειτα φυγοκεντρούμε σε 3000 g για 15' ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα ,αλλά να αποτραπεί η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολουθεί η επώαση στα αραιωμένα με EDTA δείγματα, για να επιτύχουμε την πιο εύκολη καθίζηση της καζεΐνης, αποδεσμεύοντάς το ασβέστιο από το σύμπλοκο αυτό. Στην συνέχεια ακολουθούνται 2 διαδοχικές φυγοκεντρίσεις στα 12.000g, για την καθίζηση των λιποσφαιρίων, και στα 30.000 g, με στόχο την καθίζηση της καζεΐνης και των μεγαλύτερων κυστιδίων (< 1 mikrometer) από 1 ώρα και συλλογή του υπερκειμένου και στις δύο. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα, ώστε να καθαριστεί το δείγμα από τα εναπομείναντα κυστίδια, με φίλτρο 0,22 PES.

Ακολουθεί η κατακρήμνιση του εξωσωματικού ιζήματος με PEG 8000 kDa 50% w/v σε τελική συγκέντρωση 12% w/v. Έπειτα ανάδευση με vortex και επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες (O/N) υπό ανακίνηση (1.500 rpm). Σειρά έχει μία ακόμη φυγοκέντρωση στα 22.500 g για 60' στους 4°C και έπειτα απόρριψη του υπερκειμένου. Τέλος, επαναδιαλύουμε το ίζημα με 20 μl PBS. Σε αυτό το στάδιο εφόσον έχει πραγματοποιηθεί ο προ καθαρισμός και τα εξωσώματα βρίσκονται συγκεντρωμένα και έτοιμα προς απομόνωση, επιτρέπεται η αποθήκευση αυτών σε θερμοκρασία -80oC για περαιτέρω αναλύσεις.

3.2.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση

Η επιτυχία και το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα της τεχνικής απομόνωσης των εξωκυττάρων κυστιδίων με υπερφυγοκέντρωση βασίζεται σε παράγοντες, όπως η επιτάχυνση (g), ο τύπος της κεφαλής και τα χαρακτηριστικά της (ο συντελεστής k, η ακτίνα περιστροφής και το μήκος διαδρομής καθίζησης), καθώς και το ιξώδες του αρχικού δείγματος. Για να έχουμε την καλύτερη δυνατή απόδοση στην τεχνική αυτή, οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι το ιξώδες του δείγματος, γι' αυτό τον λόγο, προτείνεται αραιώση του δείγματος με PBS και αύξηση ταχύτητας και χρόνου της φυγοκέντρωσης στα περισσότερα βιολογικά υγρά.

3.2.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με παρουσία μονής στοιβάδας σουκρόζης

Όλες οι υπερφυγοκεντρήσεις έγιναν με την υπερφυγόκεντρο Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή MLA-50 (σταθερής γωνίας). Για την πραγματοποίηση των υπερφυγοκεντρήσεων χρησιμοποιήθηκαν τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου (OptiSeal Polypropylene) όγκου 32.4ml και διαστάσεων 25 × 77 mm.

Δείγματα, τα οποία ήταν παγωμένα, ξεπάγωσαν ομαλά και σταδιακά πρώτα σε πάγο και έπειτα σε νερό. Παράλληλα ετοιμάζουμε τα ειδικά φιαλίδια τοποθετώντας 4 ml σουκρόζης συγκέντρωσης 30%. Έπειτα ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στα 100.000g για 90 λεπτά στους 4oC, δημιουργώντας μια οπή στο κάτω μέρος του falcon συλλέγουμε το περιεχόμενο στάγδην σε 5 erpendorf και συλλέγουμε την στοιβάδα σουκρόζης, 1 ml έκαστος. Τοποθετήθηκαν 30 ml με PBS και επανατοποθετούμε σε νέο falcon για μια ακόμη υπερφυγοκέντρωση στα 200.000g για 120 λεπτά στους 4oC. Καθώς ολοκληρωθεί και η δεύτερη φυγοκέντρωση ανοίγουμε προσεκτικά το falcon και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Αφήνουμε το falcon να στεγνώσει και στη συνέχεια επαναδιαλύουμε το ιζήμα που έχει δημιουργηθεί με PBS. Τα δείγματα τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για περεταίρω αναλύσεις, τοποθετήθηκαν 600μl σε erpendorf και αποθηκεύτηκαν στου -80oC. Σύμφωνα με τον Gupta και τους συνεργάτες του το 2018, το δείγμα που πρόκειται να γίνει ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών με WB, τοποθετήθηκε 200μl PEG 50% w/v (τελική συγκέντρωση 12% w/v) και επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες (O/N) υπό ανακίνηση (1.500 rpm) στους 4oC, για κατακρήμνιση των εξωσωμάτων, συγκεντρώνοντας τον τελικό όγκο των εξωσωμάτων. Σε δείγματα τα οποία πρόκειται να αναλυθούν αργότερα, γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος με PBS και αποθήκευση στους -80oC.

- Μεταφορά προ-καθαρισμένου δείγματος σε φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου πάνω από στρώμα 4 ml σουκρόζης 30% w/v.
- Φυγοκέντρωση 100.000g/90'/4oC
- Λήψη στρώματος σουκρόζης που περιέχει τα εξωσώματα.
- Αραίωση στρώματος σουκρόζης σε 30 ml PBS
- Φυγοκέντρωση 200.000g/2h/4oC.

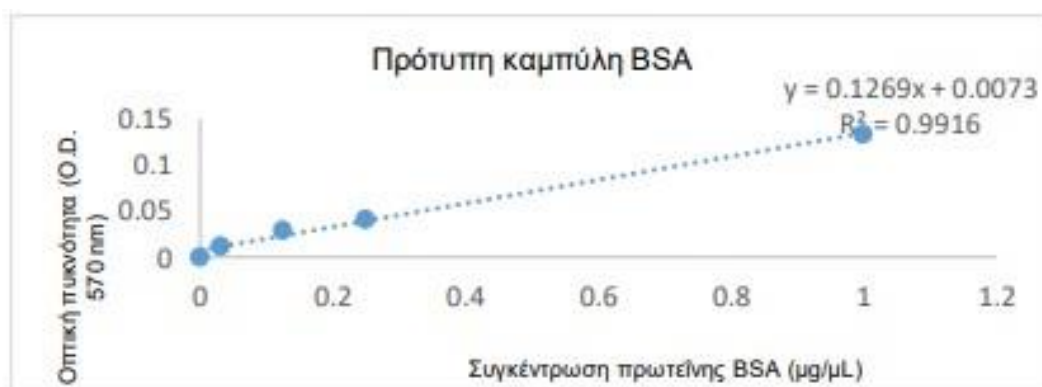
- Επαναιώρηση ιζήματος (εξωσώματα) σε PBS
- Προσθήκη PEG 8000 kDa. 50% w/v (τελική συγκέντρωση 12% w/v)
- Επώαση O/N 4oC υπό ανάδευση (1500 rpm)
- Επαναιώρηση ιζήματος (εξωσώματα) σε PBS
- Αποθήκευση σε -80oC

3.3 Λύση εξωσωμάτων και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Λόγω της ξεχωριστής δομής των μεμβρανών των εξωσωμάτων (μεμβράνες με ιδιαίτερη λιπιδική σύσταση που προσδίδει ιδιαίτερη σταθερότητα σε θερμοκρασία και pH), επιλέχθηκε διάλυμα πολύ ισχυρό για την λύση των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή λύση αυτών. Έχει αποδειχθεί ότι το διάλυμα RIPA είναι το πιο αποτελεσματικό για την διαδικασία αυτή. Επιπλέον το συγκεκριμένο διάλυμα ενδείκνυται για ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western Blot. Στην παρούσα εργασία δοκιμάσαμε να ανιχνεύσουμε τις πρωτεΐνες CD81, TSG101, Alix, HSP70, CD63 και Flotillin 1 για αυτό επιλέξαμε το διάλυμα λύσης RIPA (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Η λύση των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε βάση των οδηγιών που αναγράφονται στο εγχειρίδιο χρήσης του διαλύματος RIPA από την Thermo Fisher Scientific. Ακολουθεί και συνοπτικά η διαδικασία λύσης των εξωσωμάτων, η οποία έγινε ως εξής :

- Προσθήκη διαλύματος RIPA, παρουσία αναστολέων πρωτεασών (τελική αραίωση 1×)
- Εφαρμογή κύκλων υπερήχων (30’’ υπέρηχοι και 30’’ επώαση στον πάγο)
- Ήπια ανακίνηση (300-400 rpm) για 15’ στον πάγο
- Φυγοκέντρωση 14000g/15’/4oC
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf, απόρριψη ιζήματος
- Διατήρηση στους -80 °C ή περαιτέρω επεξεργασία

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών από τα δείγματα έγινε με το kit protein Quantification assay (Macherey Nagel). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($OD_{570nm} = f(CBSA)$)



γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες μg/μl.

Προσθήκη μικρού όγκου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στην μικροπλάκα. Αραίωση δείγματος ώστε ο τελικός όγκος που θα προκύψει να είναι 20 μl. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν 1:5 και 1:10. Ως μέσο αραιώσης χρησιμοποιήθηκε dH₂O είτε το διάλυμα RIPA

- Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου PSB. Το δείγμα αποκτά μπλε χρώμα
- Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου QR (Quantification Reagent). Το χρώμα του δείγματος αμέσως μετά την προσθήκη του QR μετατρέπεται σε κίτρινο
- Σύντομη ανάδευση της μικροπλάκας με ήπιους χειρισμούς ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30'
- Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης στα 570 nm 7. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μg/μl) με βάση την πρότυπη καμπύλη

3.4 Western Blot

Η μέθοδος Western Blot (Ανοσοαποτύπωση) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, η οποία αποτελείται από πολλά στάδια, που στόχος είναι να ανιχνεύσει συγκεκριμένη πρωτεΐνη, ανάμεσα από ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών, με γνώμονα το μοριακό μέγεθος της πρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει με τη βοήθεια ενός gel ηλεκτροφόρησης. Ύστερα τα αποτελέσματα που βρίσκονται στο gel μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη με την χρήση ηλεκτρικού ρεύματος και τέλος η μεμβράνη αυτή επωάζεται με συγκεκριμένα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα, τα οποία φέρουν φθορίζοντα μόρια, ώστε να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης.

Στην παρούσα εργασία, εφόσον προσδιορίστηκε ο κατάλληλος όγκος δείγματος, έγινε αραίωση με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και θέρμανση στους 95 για 10', έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η τοποθέτηση τους στα φρεάτια γέλης. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται Laemmli Buffer και αποτελείται από SDS, το οποίο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό ομοιόμορφο φορτίο σε σταθερό pH., β – μερκαπτοαιθανόλη (BME), όπου συμβάλει στην μετουσίωση των πρωτεϊνών τεταρτοταγής δομής κυρίως, επίσης περιέχει tris, που βοηθά να κρατά το pH 6,8, του διαλύματος σταθερό ώστε να δρουν αποτελεσματικά όλα τα συστατικά του. Επιπλέον προσθέτουμε γλυκερίνη, η οποία λόγω της πυκνότητάς της βοηθά το δείγμα να μην επιπλέει και τέλος τη χρωστική ουσία, μπλε βρωμοφαινόλης, όπου βοηθά στο να έχουμε άμεση οπτική επαφή του δείγματος.

Οι πρωτεΐνες κινούνται ανάλογα με το μέγεθος και το μοριακό τους βάρος. Δημιουργήσαμε λοιπόν το gel ηλεκτροφόρησης και το gel επιστοιβαξης 5% και 10% αντίστοιχα. Οι ζώνη επιστοιβαξης αποσκοπεί σε μια ώστε να υπάρχει κοινό σημείο έναρξης, καθώς θα εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου με το δις – ακρυλαμίδιο σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία παραγόντων όπως το υπερθειικό αμμώνιο και το TEMED. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, έπειτα από περίπου 20 -30 λεπτά, τοποθετείται μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης ώστε να ευθυγραμμιστεί η στάθμη. Έπειτα με κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα (Running Buffer 1%), για να βρίσκεται σε επαφή όλο το ύψος της συσκευής. Ηλεκτροφορούνται ισόποσοι όγκοι δειγμάτων και στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετείται ο μάρτυρας. Με τη βοήθεια

τροφοδοτικού διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής τάσης 110- 140 V στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μεταξύ δεξαμενής και συσκευής ηλεκτροφόρησης.

3.5 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Για να συνεχίσουμε τη διαδικασία θα χρειαστεί να μεταφέρουμε τα αποτελέσματά μας σε ειδική μεμβράνη με τη χρήση συσκευής «κασέτας» και ηλεκτρικού ρεύματος. Η συσκευή αυτή αποτελείται από δύο πλάκες ,την άνοδο και την κάθοδο. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ημι - στεγνής μεταφορά. Μεταφέροντας τα πηκτώματα από την τη μία συσκευή στην επόμενη επωάζουμε το πήκτωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με έξι διηθητικά χαρτιά.

Στο τμήμα της συσκευής που αποτελεί την κάθοδο τοποθετούμε τρία διηθητικά χαρτιά , την μεμβράνη αφού την εμβαπτίσουμε για 30’’ σε μεθανόλη, το πήκτωμα και από πάνω τα υπόλοιπα τρία διηθητικά χαρτιά (διάταξη σάντουιτς).

Τέλος συνδέουμε το τροφοδοτικό και το ρυθμίζουμε στα 0,27 A για 50’ , ώστε να ολοκληρωθεί η μεταφορά.

3.6 Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων - Ανοσοανίχνευση

Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 25 ml διαλύματος αποκλεισμού, σκόνη άπαχου γάλακτος, BSA, με ήπια ανακίνηση για μία ώρα ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις στην μεμβράνη των 5 λεπτών με TBTS με ανακίνηση ,ώστε να διώξουμε την περίσσεια του διαλύματος. Η τοποθέτηση, υπό ανάδευση τους πρωτογενούς αντισώματος, περίπου 10ml έγινε στους 4°C για 12-16 ώρες και στη συνέχεια το αντίσωμα επανασυλέχθηκε και πραγματοποιήθηκαν πλύσης με TBS -T για να απομακρύνουμε την περίσσεια. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε, είναι ξεχωριστό και μοναδικό για κάθε εξεταζόμενη πρωτεΐνη και για να προσδεθεί στην κάθε πρωτεΐνη έχει υποστεί αραίωση με TBS- T. Ύστερα κατά τον ίδιο τρόπο τοποθετήσαμε το δευτερογενές αντίσωμα, όπου έγινε επώαση, υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με τις αντίστοιχες 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBS -T να ακολουθούν. Χρησιμοποιήθηκαν

δυο ειδών δευτέρων αντισωμάτων ανάλογα με το είδος του ζώου που παράχθηκε το πρώτο αντίσωμα. Για να γίνουν εμφανή οπτικά τα αποτελέσματα, γίνεται χρήση της μεθόδου της χημειοφωταύγειας. Χημειοφωταύγεια ορίζεται μια χημική αντίδραση, όταν από την ενέργεια όπου προκύπτει από αυτήν, απελευθερώνεται φως. Στην συγκεκριμένη περίπτωση στον δευτερογενές αντίσωμα βρίσκεται συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης που παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης και εκπέμπονται φωτόνια. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, αφού οι πλύσεις ολοκληρώθηκαν, η μεμβράνη επωάστηκε με το υπόστρωμα ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Τέλος η ανίχνευση

έγινε σε μηχάνημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας και λήφθηκε ψηφιακή λήψη εικόνας στο μηχάνημα ImageQuant 800, Cytiva. Ο χρόνος της εμφάνισης ζωνών ποικίλει, ανάλογα με την συγκέντρωση της εκάστοτε πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία κυμαίνεται από 15 δευτερόλεπτα έως 9 λεπτά.

Διαλύματα απαραίτητα για την τεχνική απομόνωσης

PBS 10x 1L		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
NaCL	80g	
KCl	2g	
Na ₂ HPO ₄	14,4g	
KH ₂ PO ₄	2,4g	
dH ₂ O		1L

Διάλυμα PEG 8000 kDa(50%)

Διάλυμα PEG 50%		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
Σουκρόζη	15g	
PBS 1×		30ml

Διάλυμα σουκρόζης

Διάλυμα σουκρόζης		
Σουκρόζη	24G	
PBS 1×		40ml

Διαλύματα απαραίτητα για την τεχνική Western blot

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (RIPA – radioimmunoprecipitation assay buffer)

Συστατικά	Αρχικά διαλύματα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
NaCl	5M	3ml	150mM
Tris -HCl	1M, pH 7,6	2,5ml	25Mm
NP -40		1ml	1%v/v
Sodium Deoxyxholate	10 %	10ml	1%w/v
SDS	10%	1ml	0,1 w/v
dH2O		82,5ml	-

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

Laemli Buffer 4Í, 10ml				
Συστατικά	Αρχικά διαλύματα	Όγκος	Μάζα	Τελική Συγκέντρωση
Tris -HCL	1M, pH 6,8	2,4		240Mm
SDS			0,8g	8% w/v
dH ₂ O		2,1ml		
Κυανό της βρωμοφαινόλης			4g	0,1 %w/v
Γλυκερόλη	80%	5ml		40% v/v
β- μερκαπτοαιθανόλη		0,5 ml		5%

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10×

Running Buffer) 10× 1L			
Συστατικά	Μάζα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Tris -HCL	30,30g		250mM
Glycine	144g		1,92M
SDS	10g		1% w/v
dH ₂ O		1L	

Ρυθμιστικό διάλυμα ημι-στεγνής μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer) 10×

Transfer Buffer 10× 500ml			
Συστατικά	Μάζα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Tris -HCL	15,5g		250mM
Glycine	72g		
SDS	5g		1 w/v
dH ₂ O		500ml	

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10×

TBS 10x 1L		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
Tris -base	24g	
NaCl	88g	
dH ₂ O		1L

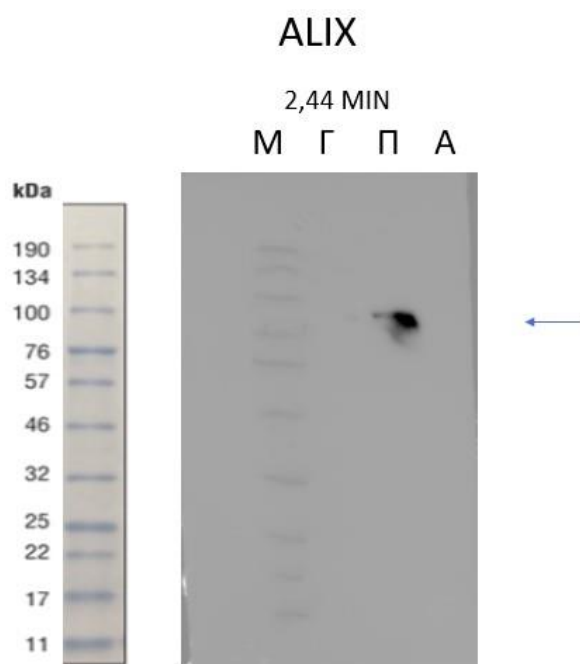
4 Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Τ Ε Τ Α Ρ Τ Ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκαν δείγματα γάλακτος την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων, πραγματοποιήθηκε με διαφορετική υπερφυγοκέντρωση παρουσία σουκρόζης που ακολουθήσαμε έγινε χρήση Western Blot για την ύπαρξη συγκεκριμένων διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών δεικτών, σύμφωνα με κριτήρια της ISEV για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων.

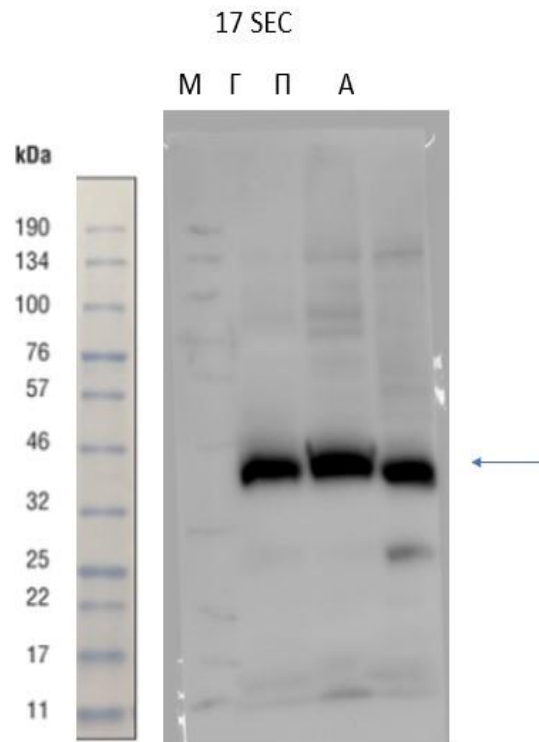
Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες, οι οποίες αναζητούσαμε και εντοπίστηκαν στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα ,όπου προήλθε από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων είναι TSG101, CD81, CD63, Hsp70, Flotillin και Alix. Οι πρωτεΐνες TSG101 και Alix είναι κυτταροπλασματικές και ρόλος τους είναι η δέσμευση των εξωσωμάτων με άλλες μεμβράνες. Αντίστοιχα οι πρωτεΐνες CD81 και CD63 είναι τετρασπανίνες, οι οποίες απαντούν προσδεμένες στην μεμβράνη των εξωσωμάτων. Οι πρωτεΐνες αυτές σε συνδυασμό με τις HSP70 και Flotillin μαρτυρούν την ύπαρξη λιπιδιακής διπλοστοιβάδας σε δείγματα εξωσωμάτων. Ως αρνητικός μάρτυρας θα μπορούσε να οριστεί η καζεΐνη ή β-λακτογλοβουλίνη.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των εξωσωμάτων, όπου στον προκαταρκτικό καθαρισμό των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν φυγοκεντρήσεις για την απομάκρυνση του λίπους και άλλων κυττάρων και θραυσμάτων αυτών καθώς επίσης έγινε προσθήκη EDTA για την διευκόλυνση της απομάκρυνσης του ασβεστίου από την καζεΐνη. Ακολούθησαν οι υπερφυγοκεντρήσεις παρουσία σουκρόζης, εφόσον τα εξωσώματα κατακρημνίστηκαν με PEG, δημιουργώντας ένα ευδιάκριτο ίζημα εξωσωμάτων και έπειτα η ανίχνευσή τους όπως αποτυπώνεται στις παρακάτω εικόνες.



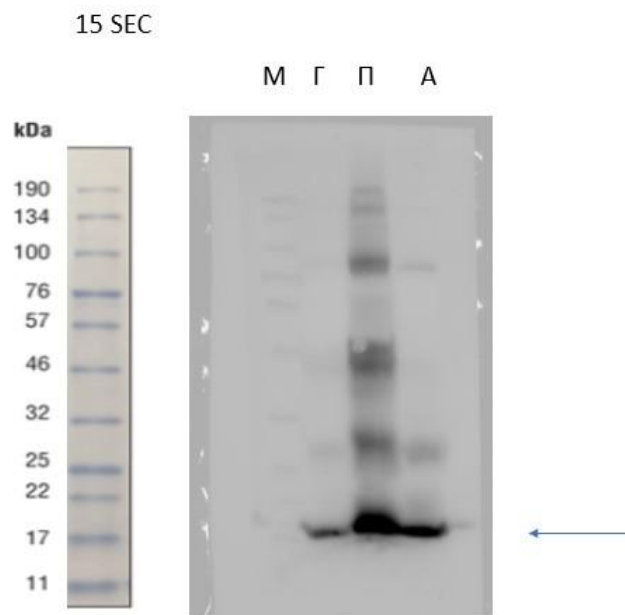
Εικόνα 3. Ανίχνευση της Alix σε γάλα αίγας(γίδα),προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της (Alix 85kDa), χρόνος έκθεσης 2,44', αραίωση 1:500

TSG 101



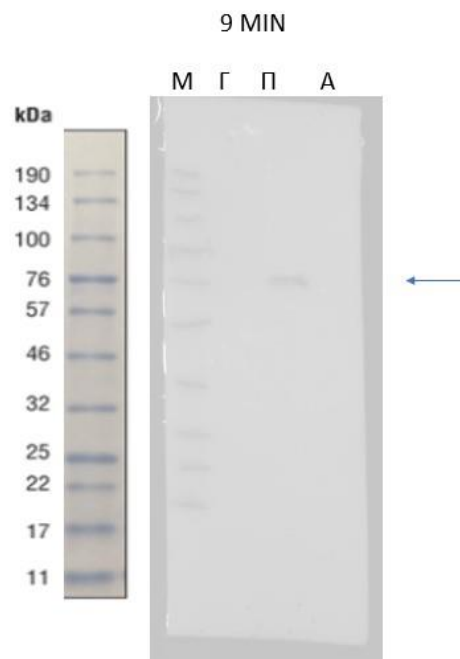
Εικόνα 4. Ανίχνευση της TSG101 σε γάλα αίγας(γίδας),προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της (TSG101 44 kDa), χρόνος έκθεσης 17'', αραιώση 1:250.

CD81

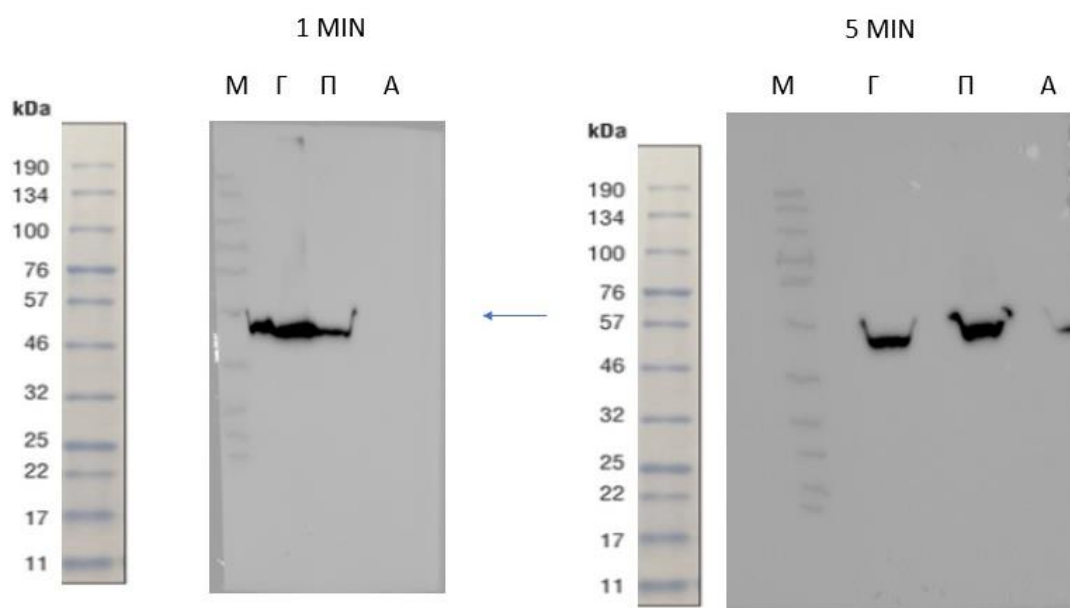


Εικόνα 5. Ανίχνευση της CD81 σε γάλα αίγας(γίδας),προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της (CD81 26 kDa), χρόνος έκθεσης 15'', αραιώση 1:500,

HSP70



Εικόνα 6. Ανίχνευση της HSP70 σε γάλα αίγας(γίδας),προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της (HSP70 70 kDa), Χρόνος έκθεσης 9', πολυκλωνικό Rabbit anti-Human Hsp70, αραιώση 1:1000,



Εικόνα 7. Ανίχνευση της Flotillin1 σε γάλα αίγας(γίδας), προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της (Flotillin1 47 kDa), 1' & 5', μονοκλωνικό Rabbit anti-Human Flotillin-1, αραιώση 1:1000,

Όπως βλέπουμε στις παραπάνω μεμβράνες Western, οι πρωτεΐνες που αποτελούν βιοχημικούς δείκτες ύπαρξης εξωσωμάτων μαρτυρούν ξεκάθαρα την ύπαρξη εξωσωμάτων στα δείγματα γάλακτος αίγας, προβάτου και αγελάδας που αναλύσαμε. Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη HSP70 εμφανίζει σήμα μόνο στο γάλα προβάτου, πιθανολογείται ότι συμβαίνει λόγω μη ιστοιδικότητας του αντισώματος . Οι πρωτεΐνες εξέπεμψαν σήμα σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, εκτός από την CD63, παρόλα αυτά η απομόνωση κρίνεται επιτυχής.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα εξωκυττάρια κυστίδια (EVs) όπως προαναφέρθηκε περιεγράφηκαν για πρώτη φορά στις δεκαετίες του 1960 και 1970 και θεωρήθηκαν απλά κυτταρικά τεχνουργήματα χωρίς βιολογικό σκοπό (Yanez-Mo και συν. 2015 ; Witwer, 2019). Μόλις τη δεκαετία του 1990 αποδόθηκε στα EVs ένας ρόλος στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων, κερδίζοντας έτσι αυξημένη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα (Tkach, Kowal, Thery, 2018)]. Έκτοτε, τα EVs έχουν απομονωθεί από όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών και είναι γνωστό ότι υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα σωματικά υγρά, αποτελώντας ένα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας (Zempleni, Sukreet, Zhou, Wu, & Mutai, 2019). Τα εξωσώματα του γάλακτος μπορεί να περιέχουν ή να συνδέονται με διάφορες ενώσεις με πιθανές ευεργετικές επιδράσεις, όπως αντισώματα, λειτουργικά λιπίδια ή ολιγοσακχαρίτες. Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα από τους He et al., διάφοροι ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένης της 2-φουκοσυλλακτόζης παρουσιάζουν πρεβιοτικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες (Shi et al., 2020).

Τα εξωσώματα του γάλακτος έχουν συνδεθεί με την πρόληψη διαταραχών που σχετίζονται με την περιγεννητική υγεία, και ενδέχεται να διαμορφώνουν ευρείες πτυχές της ανοσίας και της ανάπτυξης, αλλά μελέτες που αναλύουν βρεφικά παρασκευάσματα έχουν αναφέρει πολύ χαμηλές ποσότητες εξωσωματικών miRNA σε αυτά τα σκευάσματα. Αρκετοί συγγραφείς έχουν εξετάσει την προσθήκη εξωσωμάτων γάλακτος που περιέχουν miRNA στα βρεφικά παρασκευάσματα ως στρατηγική για τη μείωση του επιπολασμού των εντερικών διαταραχών (Xie et al., 2019). Ομοίως, η προσθήκη miRNA φορτία που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ο miR-155, θα μπορούσε να συμβάλει στην πρόληψη της ατοπικής νόσου στα βρέφη. Άλλα miRNA φορτία που σχετίζονται με τη νευροανάπτυξη, το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την επαρκή βρεφική αύξηση και ανάπτυξη (Carrillo-Lozano et al., 2020). Συνολικά, τα οφέλη του μητρικού θηλασμού είναι καλά τεκμηριωμένα στη βιβλιογραφία και η φυσική παρουσία εξωσωμάτων στο μητρικό γάλα παρέχει μια νέα διάσταση στην περιγεννητική διατροφή. Τα βρεφικά παρασκευάσματα θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την προσθήκη αυτών των φυσικών ενώσεων ως βιοδραστικών

συστατικών. Επιπλέον, τα βρέφη και οι ενήλικες θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τις πιθανές θετικές επιδράσεις των εξωσωμάτων του γάλακτος σε τομείς όπως η μυϊκή δύναμη, οι διεργασίες οστεοπόρωσης, η ανοσία και η εντερική υγεία. Η παρουσία εξωσωμάτων στο μητρικό γάλα μπορεί να αποτελέσει αλλαγή στο πρότυπο της ανθρώπινης διατροφής και αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας. Τα εξωσώματα του γάλακτος περιέχουν μια ποικιλία βιοδραστικών φορτίων, τα οποία έχει αναφερθεί ότι ασκούν ευεργετικές επιδράσεις σε πολλαπλά επίπεδα, μεταξύ άλλων στην ανοσία, την εντερική και μυοσκελετική υγεία, τον εντερικό μικροβιόκοσμο, την αύξηση και την ανάπτυξη. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την εξαγωγή σε κλινικές μελέτες των ελπιδοφόρων αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν σε προκλινικές μελέτες. υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα σωματικά υγρά, αποτελώντας ένα αναπτυσσόμενο ερευνητικό πεδίο (El Andaloussi et al., 2013).

Επίσης σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, τα εξωσώματα του γάλακτος έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν το αντίξοο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα και να καταλήγουν στον επιθηλιακό φραγμού του εντέρου όπου απορροφούνται και διαχέονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους εκάστοτε ιστούς, ανάλογα με τα κύτταρα στόχους- αποδέκτες. (Jorge García-Martínez, et al., 2022) Έτσι τα εξωσώματα γάλακτος είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική είτε ως βιοδραστικών συστατικών τροφίμων αυτούσια ή εμπλουτισμένα, είτε ως θεραπειών και φαρμάκων από το στόμα, εμπλουτισμένα με τα κατάλληλα συστατικά. Συγκεκριμένα στο γάλα θα ήταν εύλογο είτε να εμπλουτιστούν τα εξωσώματα γάλακτος είτε οι φόρμουλες να αναμειχθούν με εξωσώματα πρωτογάλατος, τα οποία είναι αποδεδειγμένα πιο πλούσια με αντισώματα. Πάντοτε με προσοχή, καθώς χρήση εξωσωμάτων, από μη υγιή ζώα, ενδεχομένως να περιέχουν RNA που επηρεάζουν αρνητικά την υγεία του νεογνού και γενικότερα του οργανισμού που πρόκειται να χορηγηθούν. (Wang, et al., 2021) Δεδομένου της νέας αυτής πολλά υποσχόμενης τεχνολογίας, απαιτούνται τεχνικές όπου να παρέχουν καθαρά και ακέραια εξωσώματα, χωρίς μεγάλες αλλαγές στην επιφάνειά του.

Στην τεχνική την οποία χρησιμοποιήσαμε βασισμένοι στην μέθοδο που εφάρμοσε ο Warren και η ομάδα του κατά τη διάρκεια του προ- καθαρισμού χρησιμοποιήσαμε EDTA ώστε να επιτύχουμε ευκολότερη καθίζηση της καζεΐνης, αποδεσμεύοντας το ασβέστιο από το σύμπλοκο της καζεΐνης- ασβεστίου, ώστε να απομακρυνθεί. Στην συνέχεια συνδυάζοντας την τεχνική που προαναφέραμε καθώς και του Gupta και

Vaswani και των ομάδων τους, συνεχίσαμε προσθέτοντας διάλυμα PEG και φυγοκεντρώντας το δείγμα ώστε να δημιουργήσουμε ένα ισχυρό ίζημα εξωσωμάτων, μετέπειτα ακολουθεί μια διαδικασία δύο υπερφυγοκεντρήσεων παρουσία σουκρόζης 30%. (Vaswani, et al., 2019) (Warren, et al., 2020) (Gupta, et al., 2018). Συνδυάζοντας τις τεχνικές αυτές και δεδομένου του εξοπλισμού όπου το εργαστήριό μας παρείχε, έχουμε βέβαιη απομόνωση ακέραιων εξωσωμάτων. Με το συνδυασμό των τεχνικών που χρησιμοποιήσαμε στοχεύουμε στην καλύτερη δυνατή απόδοση και καθαρότητα του παρασκευάσματος των εξωσωμάτων, μέσω υπερφυγοκέντρωσης, τη χρήση PEG και της σουκρόζης, καθώς και του πρωτοκόλλου του προκαταρτικού καθαρισμού. Έχουν εντοπίσει δυο από τις ενδοκυτταρικές μεμβρανικές πρωτεΐνες στο τελικό μας δείγμα σε εξωσώματα από τρία είδη μηρυκαστικών ζώων. Παρόλα αυτά μένει να εξεταστεί η πληρότητα του καθαρισμού με οπτικοποίηση και προσδιορισμό της σύστασης του παρασκευάσματος με ηλεκτρονική μικροσκοπία (TEM) και την ανάλυση των σωματιδίων με NanoTracking Analysis (NTA).

Συνολικά, στην παρούσα εργασία, επιτεύχθηκε απομόνωση και βιοχημικός προσδιορισμός δεικτών εξωσωμάτων για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων από γάλα αίγας, προβάτου και αγελάδας. Παρέχεται έτσι η δυνατότητα περαιτέρω διερεύνησης για το περιεχόμενο του φορτίου τους, και του εμπλουτισμού τροφών με αυτά, αλλά και ως μεταφορείς βιοδραστικών ουσιών.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aqila, F. R. M.-H. (2019). Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Letters*, 186-195.
- Carrillo-Lozano, E.; Sebastian-Valles, F.; Knott-Torcal, C. (2020). Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients*, 12, 3066.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., ... & Lötval, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*, 2(1), 20677
- Cvjetkovic, A., Lötval, J., & Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 23111.
- Deng, F.J. M. (2019). A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *JOURNAL OF HISTOTECHNOLOGY*, 226 - 239.
- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O. & Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov*, 12, 347–357.
- Garcia-Romero, N., Madurga, R., Rackov, G., Palacin-Aliana, I., Nunez-Torres, R., Asensi-Puig, A., ... & González-Rumayor, V. (2019). Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation. *Journal of translational medicine*, 17(1), 75.

Givens, D. I. (2020, June 16). MILK Symposium review: The importance of milk and dairy foods in the diets. *J. Dairy Science*, pp. 9681–9699.

Gupta, S., Sonali Rawat, Vivek Arora, Sarat Kumar Kottarath, Amit Kumar Dinda,, Pradeep Kumar, Sujata Mohanty. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell REsearch and Therapy*

Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. (2013). Exosomes: Looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* Vol. 200 No. 4 367–371

Kalra, H., Adda, C. G., Liem, M., Ang, C. S., Mechler, A., Simpson, R. J. & Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*, 13(22), 3354-3364.

Kalluri, R. & Lebleu, V. (2020). The biology, function, and biomedical applications. *Science*, 367. Kimura, T., Ferran, B., Tsukahara, Y., Shang, Q., Desai, S., Fedoce, A. & Matsui, R. (2019). Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Mitsis T, Pierouli. K, Diakou KL, Papakonstantinou E, Bacopoulou F, Chrousos GP, Vlachakis D. (2020). Exosomics. EMBnet. PMID: 32832420; PMCID: PMC7440046. Mulcahy, L. A. R. C., & Carter, D. R. (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24641.

Munir, J.M. L. (2020). Exosomes in Food: Health Benefits and Clinical. *Advances in Nutrition*, 687-696. Nieuwland., R. (2022). Reproducibility of extracellular vesicle research. *European Journal of Cell Biology*.

Onizuka Y, Fujita K, Ide S, Naito T, Kaji N. (2023). Antioxidants encapsulated milk-derived exosomes for functional food development.39(5):705-712. Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes Jr, D. G. (2016).

ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Scientific reports*, 6, 23978.

Shi, R.; Ma, J.; Yan, Q.; Yang, S.; Fan, Z.; Jiang, Z. (2020). Biochemical characterization of a novel α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. and its application in

synthesis of 3'-fucosyllactose and 2'-fucosyllactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 5813–5826

Sim, S. L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R. B., & Jungbauer, A. (2012). Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius. *Journal of biotechnology*, 157(2), 315-319.

Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L., & Mathivanan, S. (2009). Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert review of proteomics*, (3), 267-283.

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*, 30(1), 3-22

Tkach, M., Kowal, J., Thery, C. (2018). Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos Trans. R Soc. Lond. B Biological Science*, 373, 20160479.

Trams^a, E., Lauter^a, C.J., Salem Jr.^a, & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* Volume 645, Issue 1, 63-70

Vaswani, K., Murray D. Mitchell, Olivia J. Holland, Yong Qin Koh, Rebecca Harb, Hassendrini Peiris. (2019, December 3). A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk. *Journal of nutrition and Metabolism*.

van Niel, G., D'Angelo, Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228

Vojtech *et al.*, (2014). Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 42, 7290–7304

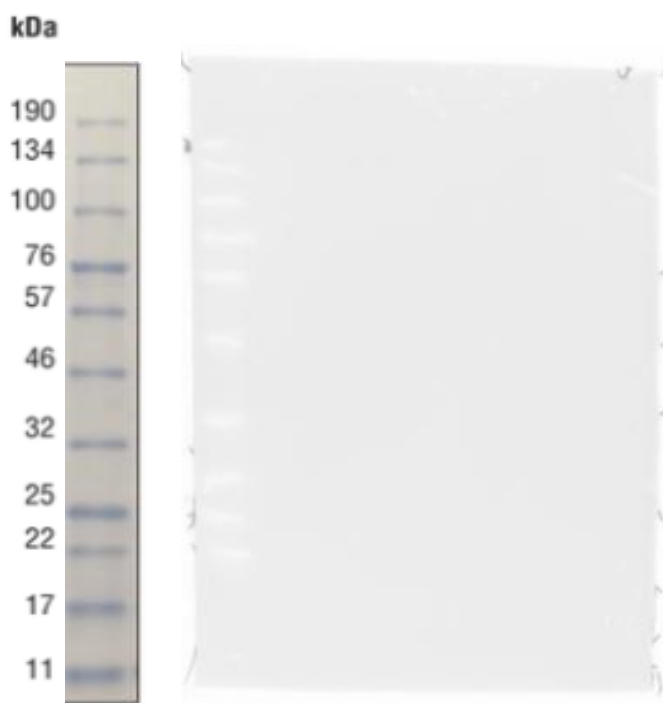
Warren, M. R., Chenzhen Zhang, Armin Vedadghavami, Krister Bokvist, Pradeep K. Dhal, & Ambika G. Bajpayee. (2020, December 7). Milk exosomes with enhanced mucus penetrability for oral delivery of siRNA. *Biomaterial Science*, pp. 4260-4277

- Welch, J. L., Kaddour, H., Schlievert, P. M. & J. T. Stapleton, J. T. (2018). Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF-kB/Sp1/Tat circuitry. *J. Virol.* 92, e00731-18
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15), 4640-4646
- Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). (2010). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press.
- Witwer, K.W. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J. Extracell. Vesicles*, 8, 1648167.
- Xie, M.Y.; Hou, L.J.; Sun, J.J.; Zeng, B.; Xi, Q.Y.; Luo, J.Y.; Chen, T.; Zhang, Y.L. (2019) Porcine Milk Exosome MiRNAs Attenuate LPS-Induced Apoptosis through Inhibiting TLR4/NF-kappaB and p53 Pathways in Intestinal Epithelial Cells. *J. Agric. Food. Chem.*, 67, 9477–9491. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- Xin, F., Xiaolin, C., Xucan, Z., Hui, Z., Qien, Q., Shen, L., Huihua, Z. & Jianwei, C. (2021). Latest Trend of Milk Derived Exosomes: Cargos, Functions, and Applications. *Frontiers in Nutrition*, Vol 8.
- Yanez-Mo, M, Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borrás, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K.; Casal, E., Cappello, F, Carvalho, J.(2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles*, 4, 27066.
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H. & Fang, J. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, 20(3), 332-343.
- Zempleni, J., Sukreet, S., Zhou, F., Wu, D. & Mutai, E. (2019). Milk-Derived Exosomes and Metabolic Regulation. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 245–262.
- Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.* 371:48–61.

Xin Feng , Xiaolin Chen , Xucan Zheng , Hui Zhu , Qien Qi , Shen Liu , Huihua Zhang and Jianwei Che (2021). Latest Trend of Milk Derived Exosomes: Cargos, Functions, and Applications, *Frontiers in Nutrition*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Η CD63 είναι μεταξύ των δεικτών ελέγχου απομόνωσης εξωσωμάτων. Στα δείγματά μας δεν ανιχνεύθηκε η CD63, πιθανόν λόγω πολύ χαμηλών επιπέδων σε αυτά.



Εικόνα 8. Ανίχνευση της CD63 σε γάλα αίγας(γίδας),προβάτου και αγελάδας, το βέλος δηλώνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και την εκτιμώμενη θέση της τα 25 kDa.