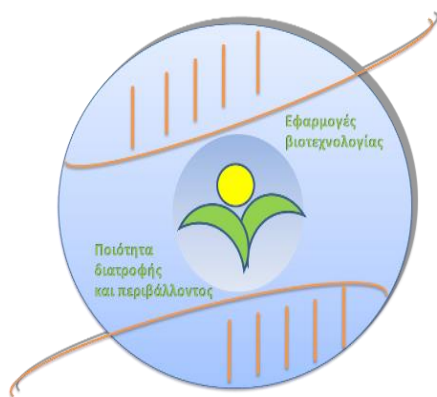




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΠΡΟΒΑΤΟΥ**

ΛΑΓΟΠΟΥΛΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

[1]

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΠΡΟΒΑΤΟΥ**

EXOSOMAL MOLECULAR MARKERS IN MILK OF SHEEP ORIGIN

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: Δέσποινα Λαγοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Μπαλατσός

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δημήτριος Βλαχάκης: Αναπληρωτής καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Ανδρέας Φώσκολος: Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής
Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από τον Ιούνιο του 2024 έως τον Δεκέμβριο του 2024, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος και για την πολύτιμη καθοδήγηση, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Δημήτριο Βλαχάκη και Ανδρέα Φώσκολο. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Φώσκολου για τη συνεργασία και την παροχή των απαραίτητων δειγμάτων και πληροφοριών που συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Θερμές ευχαριστίες και στον κ. Ιωάννη Τρουγκάκο για την για την ανάλυση των δειγμάτων και εφαρμογή της μεθόδου TEM σε αυτά, αλλά και τον κ. Γιώργο Μπαλτατζή για την μελέτη και ανάλυση των εικόνων της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα Λάμπρο Μπαλή για την βοήθεια, καθοδήγηση αλλά και για την υπόδειξη καινούργιων τεχνικών που μου ήταν απαραίτητες. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και φίλη Αικατερίνη Τσιγγενέ. Η συνεργασία μας υπήρξε πηγή στήριξης και αμοιβαίας ενίσχυσης, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία και την βοήθεια για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Είμαι ευγνώμων για τη βοήθεια και τις συμβουλές του υποψήφιου διδάκτορα Σεραφείμ Αλεξόπουλου που μου έδειξε πόσο ενδιαφέρον είναι ο κόσμος της έρευνας. Είμαι βαθιά ευγνώμων και θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την φίλη μου Ελένη, για τη συνεχή στήριξη, την κατανόηση και την πολύτιμη συμπαράσταση της σε κάθε βήμα αυτής της απαιτητικής πορείας. Τέλος, θερμές ευχαριστίες στην οικογένεια μου για την αμέριστη ηθική και υλική στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει τους μοριακούς δείκτες εξωσωμάτων σε δείγματα γάλακτος προβάτου, εστιάζοντας σε διαφορετικές φάσεις της γαλουχίας, όπως το πρωτόγαλα, το γάλα θηλασμού και το γάλα απογαλακτισμού. Τα εξωσώματα αποτελούν μικροκυτταρικά κυστίδια που απελευθερώνονται από διάφορους τύπους κυττάρων, και θεωρούνται σημαντικοί φορείς μοριακών πληροφοριών, όπως πρωτεΐνες, RNA και λιπίδια, τα οποία μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τη βιολογία του θηλασμού και την ανάπτυξη του ζώου.

Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των μοριακών χαρακτηριστικών των εξωσωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις βασικές μέθοδοι: ανοσοαποτύπωση κατά Western, ποσοτική pcr πραγματικού χρόνου (qPCR) και ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM). Η Western blot χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνών που περιέχονται στα εξωσώματα, ενώ η qPCR για την παρουσία και τα επίπεδα mRNA για διάφορους στόχους. Η TEM αφορά την παρατήρηση της μορφολογίας και της δομής των εξωσωμάτων σε μικροσκοπικό επίπεδο.

Οι φάσεις του πρωτογάλακτος, του θηλασμού και του απογαλακτισμού είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη του ζωικού οργανισμού, καθώς περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές στην ποιότητα και στη σύσταση του γάλακτος. Η μελέτη των εξωσωμάτων σε αυτές τις φάσεις μπορεί να αποκαλύψει τους βιολογικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και την ανοσολογική υποστήριξη του νεογέννητου ζώου.

Λέξεις Κλειδιά:

Εξωσώματα , Μοριακοί Δείκτες, Γάλα, Απομόνωση, Χαρακτηρισμός

Abstract

This thesis investigates molecular markers of exosomes in sheep milk samples, focusing on different stages of lactation, including colostrum, nursing milk, and weaning milk. Exosomes are small extracellular vesicles released by various cell types and are considered important carriers of molecular information such as proteins, RNA, and lipids. These molecules can provide valuable insights into the biology of lactation and animal development.

To detect and characterize the molecular features of exosomes, three main methods are used: Western blot, qPCR, and Transmission Electron Microscopy (TEM). Western blot is employed to detect specific proteins contained in the exosomes, while qPCR assesses the presence and expression levels of target mRNAs. TEM allows for the visualization of the morphology and structural characteristics of the exosomes at the microscopic level.

The colostrum, nursing, and weaning stages are critical for the development of the newborn animal, as they involve significant changes in the quality and composition of milk. Studying exosomes across these stages may reveal biological mechanisms related to nutrient transport and immune support.

Key Words:

Exosomes, Molecular Markers, Milk, Isolation, Characterization

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση των εξωκυττάρων κυστιδίων (Extracellular Vesicles, EVs)	8
1.2. Βιογένεση Εξωσωμάτων	10
1.3. Μοριακό Φορτίο Εξωσωμάτων	11
1.4. Τεχνικές απομόνωσης και χαρακτηρισμού εξωσωμάτων	13
1.5. Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Εφαρμογές των Εξωσωμάτων: Προοπτικές και Πρόοδοι	14
1.6. Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά	15
1.7. Παρουσία των εξωσωμάτων στο γάλα	16
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	18
3.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
3.1. Αντιδραστήρια.....	18
3.2. KITS	20
3.3. Δείκτες μοριακών μαζών.....	20
3.4. Υλικά-Οργανολογία.....	22
3.5. Αντισώματα:	23
3.6. Προκαταρκτικός Καθαρισμός Δειγμάτων Γάλακτος	24
3.7. Πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων από δείγματα γάλακτος :	24
3.8. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών δειγμάτων εξωσωμάτων	25
3.9. Ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western	26
3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE) .	26
3.11 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF	27
3.12. Ανοσοανίχνευση	28
3.12.1. Απομόνωση εξωσωματικού RNA από δείγματα γάλακτος	29
3.12.2.Σύνθεση cDNA για ανάλυση επιπέδων έκφρασης miRNA με qPCR.....	29
3.13. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	30
3.14. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης –TEM	32
3.14.1. Προετοιμασία δειγμάτων για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης	33
4.Αποτελέσματα.....	33
4.1. Έλεγχος Επιτυχούς Απομόνωσης και Πρωτεϊνικής Ταυτοποίησης Εξωσωμάτων μέσω Western Blot	33
4.2. Ποσοτική PCR (qPCR) για την ανίχνευση του εξωσωματικού miR-26.....	36
4.3. Μορφολογική επιβεβαίωση εξωσωμάτων μέσω TEM (Transmission Electron Microscopy)...	38
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

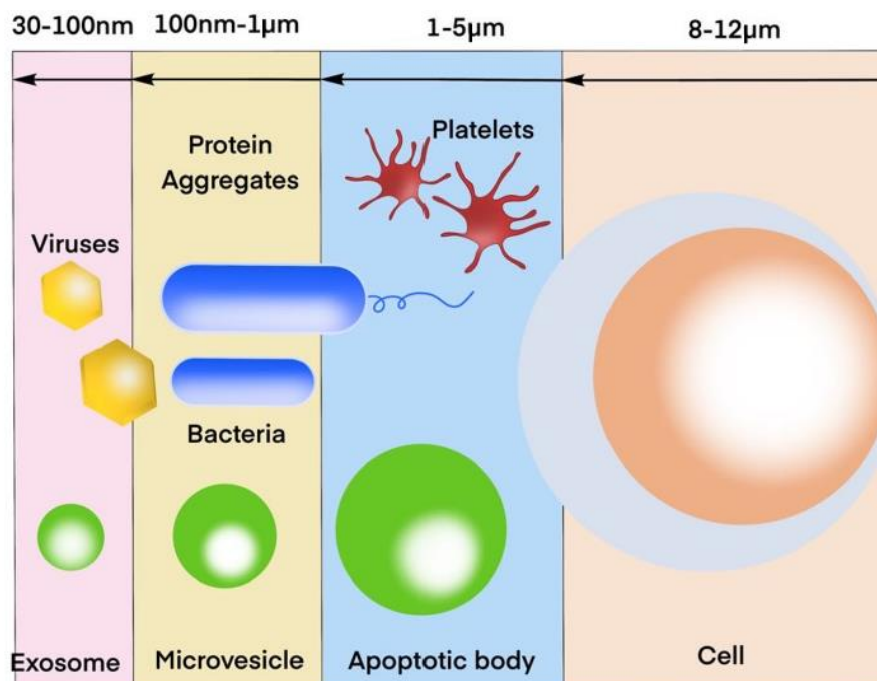
1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση των εξωκυττάρων κυστιδίων (Extracellular Vesicles, EVs)

Τα εξωκυττάρια σωματίδια ή εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) είναι μεμβρανικά σωματίδια που οριοθετούνται από μία λιπιδιακή διπλοστοιβάδα, απελευθερώνονται φυσικά από σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων αλλά, σε αντίθεση με ένα κύτταρο, δεν μπορούν να αναπαραχθούν. Τα EVs κυμαίνονται σε διάμετρο από σχεδόν το μέγεθος του μικρότερου φυσικά δυνατού μονοστρωματικού λιποσώματος (περίπου 20-30 νανόμετρα (nm)) έως και 10 μικρόμετρα (μm) ή περισσότερο, αν και η συντριπτική πλειονότητα των EVs είναι μικρότερη από 200 nm (Soleymani et al., 2023). Τα EVs ανάλογα με το μέγεθος, την πυκνότητα, την οδό σύνθεσης και των πρωτεϊνικών δεικτών που φέρουν μπορούν να διακριθούν σε εξωμερή, εξωσώματα, μικροκυστίδια, μικροσωματίδια, εκτοσώματα, ογκοσώματα και αποπτωτικά σωμάτια.

Τη δεκαετία του 1960 έγινε η πρώτη παρατήρηση των EVs σε μικροσκόπιο, ενώ ο όρος εξώσωμα αναφέρθηκε το 1987 από τη Rose Johnstone. Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια που συνδέονται με τη πλασματική μεμβράνη, εκκρίνονται από τα κύτταρα και έχουν συγκεντρώσει σημαντική προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους. Αυτά τα μικροσκοπικά σωματίδια με διάμετρο από 30 έως 100 nm, προέρχονται από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των βλαστοκυττάρων, των ανοσοκυττάρων και των καρκινικών κυττάρων και έχουν πυκνότητα από 1,13 έως 1,19 g/ml (Hessvik & Llorente, 2018). Αρχικά ανακαλύφθηκαν ως μέσο διάθεσης κυτταρικών αποβλήτων ενώ τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία, διευκολύνοντας τη μεταφορά πρωτεϊνών, λιπιδίων και RNA μεταξύ των κυττάρων (Lai et al., 2022). Έχουν μια μοναδική κυπελλοειδή μορφολογία και φαίνονται σαν πεπλατυσμένες σφαίρες, σύμφωνα με εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αντίστοιχα, τα μικροκυστίδια εκβλαστάνουν από την πλασματική μεμβράνη και έχουν μέγεθος έως και 1 μm (Gould & Raposo, 2013). Τα εκτοσώματα είναι κυστίδια διαφόρων μεγεθών (0,1–1mm σε διάμετρο) που εκβλαστάνουν απευθείας από την πλασματική μεμβράνη και αποβάλλονται στον εξωκυττάριο χώρο. Κατά παρέκκλιση με τα ζωντανά κύτταρα, τα εκτοσώματα έχουν στην επιφάνειά τους το φωσφολιπίδιο της φωσφατιδυλοσερίνης. Τα αποπτωτικά σωμάτια είναι μια μορφή EVs με διάμετρο έως 5 μm που απελευθερώνονται από κύτταρα που πεθαίνουν στο τελευταίο στάδιο της απόπτωσης και παλαιότερα θεωρούνταν ως υπολείμματα νεκρών κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι τα αποπτωτικά σωμάτια δεν είναι κυτταρικά υπολείμματα αλλά ο βιοδραστικός θησαυρός που αφήνουν πίσω τα κύτταρα που

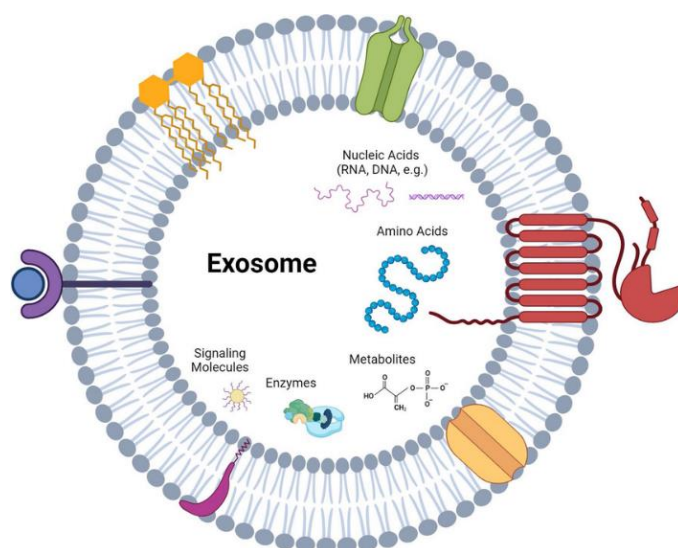
πεθαίνουν με σημαντικό ρόλο σε βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την υγεία του ανθρώπου (Z. Zhang et al., 2022).

Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε και μία νέα κατηγορία νανοσωματιδίων, τα εξωμερή που έχουν διάμετρο 35 nm και εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες EVs (H. Zhang et al., 2018). Εξαιτίας της πιθανότητας σύγχυσης λόγω ομοιότητας μεταξύ των εξωσωμάτων και των μικροκυστιδίων, η Διεθνής Κοινότητα Εξωκυτταρικών Κυστιδίων (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) ορίζει ως «EVs» όλα τα εξωκυττάρια κυστίδια. Τα διαφορετικά ονόματα ορίζονται από συγκεκριμένα φυσικά χαρακτηριστικά των EVs. Ανάλογα με το μέγεθός τους τα εξωκυττάρια κυστίδια διακρίνονται σε μικρά EVs (small EVs, sEVs) με διάμετρο μικρότερη των 100 nm, μεσαία EVs (medium EVs, mEVs) και σε μεγάλα EVs (large EVs, lEVs) με διάμετρο μεγαλύτερη των 200 nm. Επιπλέον, ανάλογα με την πυκνότητα τα EVs μπορούν να χαρακτηρισθούν ως χαμηλής, μεσαίας και υψηλής πυκνότητας (Théry et al., 2018). Η σύνθεση των EVs ποικίλλει ανάλογα με τα μητρικά τους κύτταρα, περιλαμβάνοντας πρωτεΐνες (π.χ. μόρια προσκόλλησης, κυτοκίνες, ριβοσωμικές πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και μεταβολικά ένζυμα), λιπίδια (συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης), νουκλεϊκά οξέα, όπως DNA, mRNA και miRNA, μεταβολίτες ακόμα και οργάνδια (Moghassemi et al., 2024) (Subedi et al., 2019). Τα περισσότερα κύτταρα που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα πιστεύεται ότι απελευθερώνουν EVs, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων αρχαίων, βακτηριακών, μυκητιακών και φυτικών κυττάρων που περιβάλλονται από κυτταρικά τοιχώματα.



Εικόνα 1. Αυτό το σχήμα απεικονίζει τα σχετικά μεγέθη διαφόρων βιολογικών οντοτήτων. Τα εξωσώματα, που κυμαίνονται από 30 έως 100 nm, είναι συγκρίσιμα σε μέγεθος με ιούς. Μεγαλύτερα εξωκυτταρικά κυστίδια, γνωστά ως

μικροκυτίδια, εμπίπτουν στην περιοχή από 100 nm έως 1 μm. Τα αποπτωτικά σώματα, που είναι ακόμη μεγαλύτερα, έχουν μέγεθος μεταξύ 1 μm και 5 μm. Για σύγκριση, τα αιμοπετάλια βρίσκονται στην περιοχή από 1 μm έως 5 μm, ενώ τα κύτταρα είναι σημαντικά μεγαλύτερα, με διαστάσεις 8–12 μm. Αυτό το σχήμα υπογραμμίζει την κλίμακα μεγέθους από τα εξωσώματα στα κύτταρα, καταδεικνύοντας την ιεραρχική δομή αυτών των βιολογικών συστατικών (K. W. A. Lee et al., 2024).



Εικόνα 2: Γραφική αναπαράσταση ενός εξωσώματος. Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια που περιβάλλονται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα και περιέχουν έναν αριθμό μορίων, συμπεριλαμβανομένων νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και μεταβολιτών που χρησιμεύουν ως διακυτταρικοί αγγελιοφόροι (Truby et al., 2023)

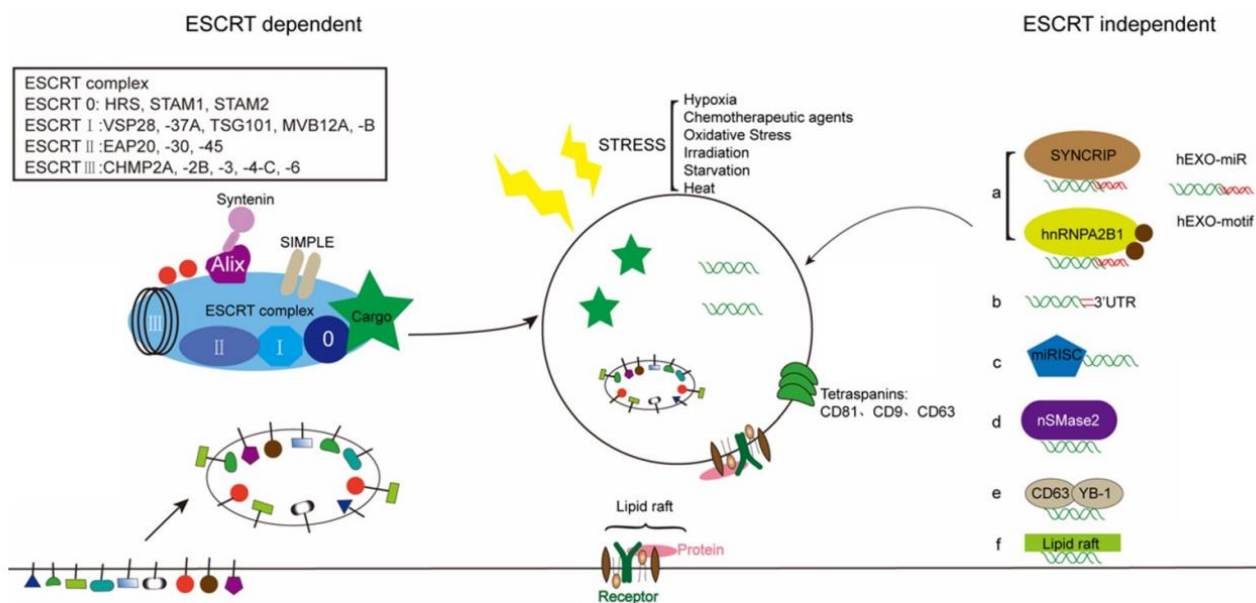
1.2. Βιογένεση Εξωσωμάτων

Η βιογένεση των εξωσωμάτων αρχίζει με το σχηματισμό πολλαπλών ενδοαυλικών κυστιδίων (Intraluminal Vesticles, IVs) μέσα σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα που ονομάζονται πολυκυψελιδικά ενδοσώματα ή Multivesicular Bodies (MVB) (Y. J. Lee et al., 2024) (Gruenberg, 2020).

Τα ILV (και συνεπώς τα εξωσώματα) μπορούν να δημιουργηθούν στην ενδοσωμική μεμβράνη με τουλάχιστον δύο μηχανισμούς, ο ένας από τους οποίους εξαρτάται από τον μηχανισμό ESCRT (ESCRT-εξαρτώμενος) (ESCRT-endosomal sorting complexes required for transport- σημαίνει ενδοσωμικά σύμπλοκα διαλογής που απαιτούνται για τη μεταφορά), ενώ ο άλλος είναι ανεξάρτητος του ESCRT. Το μονοπάτι ESCRT περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση και των τεσσάρων συμπλόκων ESCRT (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, και ESCRT-III) σε συνδυασμό με τα ένζυμα που υπάρχουν στη μεμβράνη του ενδοσώματος.

Ο μηχανισμός ESCRT διαμεσολαβεί το μονοπάτι της ουβικουτίνωσης, το οποίο αποτελείται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα- ESCRT-0, -I, -II, -III, και από την Vps4. Υπάρχουν παραλλαγές του ESCRT εξαρτώμενου μηχανισμού βιογένεσης των εξωσωμάτων, όπως η οδός συνδεκάνης-συντενίνης – Alix. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι ορισμένα φορτισμένα μόρια μπορούν να υποστούν ESCRT-ανεξάρτητη ταξινόμηση σε ILVs μέσω μιας οδού εξαρτώμενης από λιπίδια (Wei et al., 2021)

Σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των εξωσωμάτων διαδραματίζει μια κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζεται τετρασπανίνες. Οι τετρασπανίνες είναι μια οικογένεια επιφανειακών μεμβρανικών πρωτεϊνών και είναι πλούσιες σε μικρά IVs. Οι «κλασικές» τετρασπανίνες που έχουν αναγνωριστεί ως εξωσωματικά φορτία, συμπεριλαμβανομένων των CD63, CD81 και CD9, όχι μόνο συμβάλλουν εξωσωματική βιογένεση αλλά και λειτουργούν ως μοριακοί συνοδηγοί για την ταξινόμηση άλλων πρωτεϊνών σε εξωσώματα (Wei et al., 2021).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού βιογένεσης των εξωσωμάτων (Wei et al., 2021).

1.3. Μοριακό Φορτίο Εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με ένα μοναδικό περιεχόμενο πρωτεϊνών, RNAs και λιπιδίων που μπορεί να διαφέρει από το μητρικό κύτταρο. Το ενδοαυλικό περιεχόμενο της εξωσωματικής μεμβράνης εξαρτάται από τα κύτταρα ξενιστές και ιδίως από την κυτταροπλασματική τους σύνθεση (Farooqi et al., 2018).

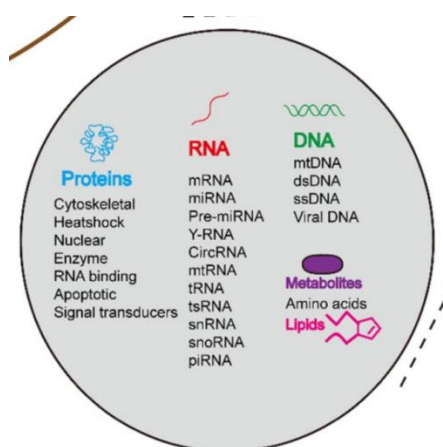
Αναφορικά με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, κατηγορίες πρωτεϊνών που συναντώνται στα εξωσώματα αφορούν πρωτεΐνες μεταφοράς διαμέσου μεμβρανών, πρωτεΐνες σύντηξης αλλά και κυτταροσκελετικές, μεταβολικές, σηματοδοτικές, πρωτεΐνες μεταφορείς και

αλβουμίνες. Επίσης περιέχονται τετρασπανίνες (CD9, CD81, CD 82, CD63), πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη βιογένεση των εξωσωμάτων μέσω του ESCRT εξαρτώμενου τρόπου (TSG-101) αλλά και πρωτεΐνες αντίστασης σε θερμικό σοκ (Hsp 60, 79 και 90).

Τα εξωσώματα περιέχουν διάφορους τύπους RNA, συμπεριλαμβανομένων των mRNA, miRNA και μη κωδικοποιημένων RNA, τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης, της σηματοδότησης και των βιολογικών λειτουργιών στα κύτταρα λήπτες. Η έκφραση του εξωσωματικού miRNA μπορεί να αλλάξει κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες, με εκλεκτικούς μηχανισμούς που καθοδηγούν συγκεκριμένους τύπους RNA στα εξωσώματα, όπως τα miR-150 και miR-320 (J. Zhang et al., 2015). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα miRNAs είναι πιο άφθονα στα εξωσώματα σε σύγκριση με τα κύτταρα ξενιστές, υπογραμμίζοντας ένα σύστημα ταξινόμησης. Αυτή η επιλεκτική φόρτωση συμβάλλει στην ποικιλομορφία σηματοδότησης και στη λειτουργική επίδραση των εξωσωμάτων (Wei et al., 2021).

Τα εξωσώματα φέρουν διάφορα λιπίδια, όπως χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια, φωσφογλυκερίδια, κεραμίδια και αλυσίδες κορεσμένων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη βιολογική τους δράση (Trajkonic et al., 2008). Αυτά τα λιπίδια παρέχουν ακαμψία, σταθερότητα και διευκολύνουν την εσωτερίκευση. Ενώ ορισμένα λιπίδια έχουν πρόσθετους ρόλους, όπως η διακίνηση και η αναγνώριση, η περιεκτικότητα των εξωσωμάτων σε λιπίδια είναι διαφορετική από αυτή του κυττάρου ξενιστή και παραμένει ανεπαρκώς χαρακτηρισμένη (Subra et al., 2010).

Σχετικά με το DNA των εξωσωμάτων, υπήρχαν διαφωνίες για τον τύπο των DNA που βρίσκονται στα εξωσώματα, ωστόσο πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα εξωσώματα περιέχουν μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), αλλά φέρουν επίσης μια μεγάλη ποσότητα πυρηνικού DNA, παρόμοια με το γενωμικό DNA (gDNA) που βρίσκεται στους πυρήνες των κυττάρων, ομοιόμορφα καταναμημένο σε όλα τα χρωμοσώματα, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω τη σημασία τους και τη δυνητική επιρροή τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες (Gurunathan et al., 2019) (Kalluri & LeBleu, 2020) (Tian et al., 2010).



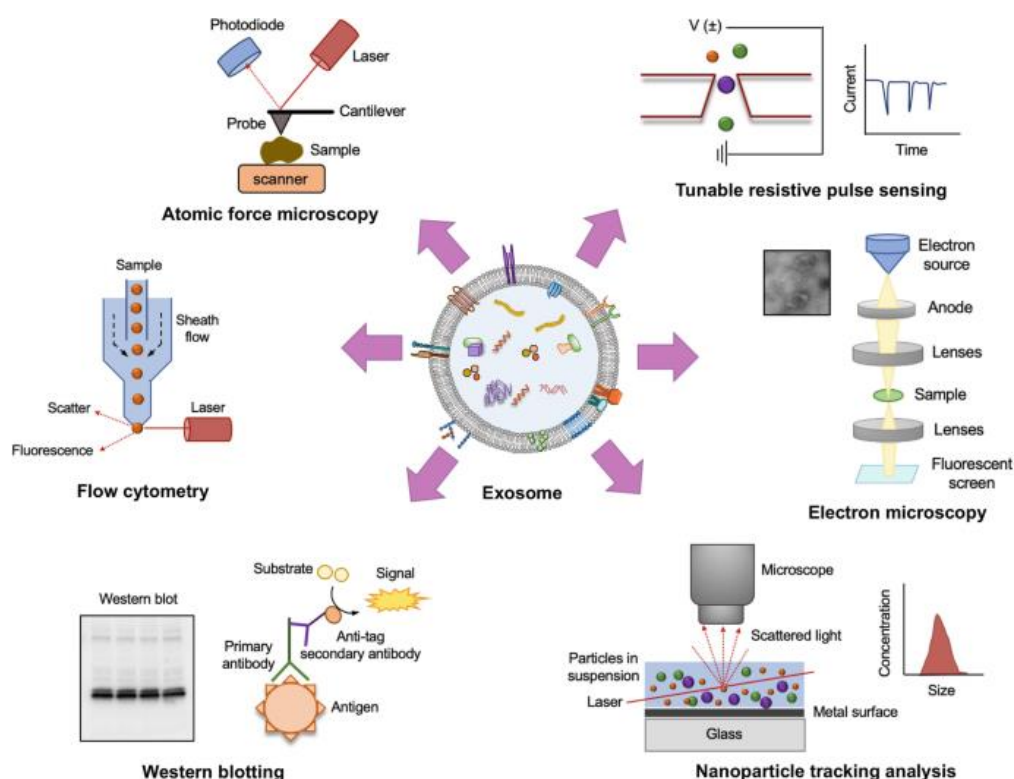
Εικόνα4 : Τα εξωσώματα περιέχουν πρωτεΐνες, RNA, DNA, μεταβολίτες και λιπίδια. Τροποποίηση από (Wei et al., 2021).

1.4. Τεχνικές απομόνωσης και χαρακτηρισμού εξωσωμάτων

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση του ρόλου τους στις βιολογικές διεργασίες και των δυνατοτήτων τους στη διάγνωση και τη θεραπεία. Για την απομόνωσή τους χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, καθεμία με μοναδικά πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Η διαφορική υπερφυγοκέντρωση, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, διαχωρίζει τα εξωσώματα με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα, αλλά μπορεί να συν-απομονώσει άλλα μόρια όπως πρωτεΐνες. Η υπερφυγοκέντρωση με βαθμίδα πυκνότητας ενισχύει την καθαρότητα χρησιμοποιώντας ένα μέσο πυκνότητας όπως σουκρόζη, σακχαρόζη ή ιωδιξανόλη. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC) διαχωρίζει τα εξωσώματα κατά μέγεθος, διατηρώντας την ακεραιότητά τους, ενώ οι μέθοδοι καθίζησης που βασίζονται σε πολυμερή χρησιμοποιούν πολυαιθυλενογλυκόλη για απλότητα, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν μη φυσαλιδώδη συστατικά. Η υπερδιήθηση διαχωρίζει τα εξωσώματα κατά μέγεθος χρησιμοποιώντας μεμβράνες αποκοπής συγκεκριμένου μοριακού βάρους και η απομόνωση ανοσοσυγγένειας προσφέρει υψηλή εξειδίκευση στοχεύοντας επιφανειακούς εξωσωματικούς δείκτες, όπως CD63, CD9 και CD81. Οι αναδυόμενες μικρορευστικές τεχνικές παρέχουν υψηλή ακρίβεια και ελάχιστες απαιτήσεις δειγμάτων (Sódar et al., 2016) (Dilsiz, 2024) (Li et al., 2017).

Οι μέθοδοι χαρακτηρισμού εξασφαλίζουν ακριβή ταυτοποίηση και λειτουργική αξιολόγηση των εξωσωμάτων. Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) και η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM) προσφέρουν απεικόνιση υψηλής ανάλυσης της δομής του εξωσώματος και της μορφολογίας της επιφάνειας, αντίστοιχα. Η Ανάλυση Παρακολούθησης Νανოსωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) μετρά το μέγεθος και τη συγκέντρωση με βάση την κίνηση Brownian, απαιτώντας εξειδικευμένο εξοπλισμό χωρίς να διαχωρίζει πάντα τα εξωσώματα από άλλα σωματίδια παρόμοιου μεγέθους, ενώ η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) αναλύει το υδροδυναμικό μέγεθος. Τεχνικές όπως η Κυτταρομετρία Ροής επιτρέπουν την πολυπαραμετρική ανάλυση επιφανειακών δεικτών και η Ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει την έκφραση της πρωτεΐνης-δείκτη. Προηγμένες μέθοδοι όπως η Φασματομετρία Μάζας παρέχουν λεπτομερή μοριακή σύνθεση, ενώ η ELISA προσφέρει υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου. Η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic force microscopy, AFM) διερευνά την τοπολογία και τις μηχανικές ιδιότητες νανοκλίμακας, ενώ η Φασματοσκοπία Raman αναλύει τη μοριακή σύνθεση των δειγμάτων. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών ενισχύει την αξιοπιστία και εξασφαλίζει την ολοκληρωμένη ανάλυση

των εξωσωμάτων, γεγονός που συμβάλλει στην προώθηση των εφαρμογών τους στην επιστήμη και την ιατρική (Shao et al., 2012) (P. Zhang et al., 2016) (Kowal et al., 2016) .



Εικόνα 5: Συνοπτική απεικόνιση τεχνικών και χαρακτηρισμού εξωσωμάτων από βιολογικά δείγματα (Singh et al., 2024)

1.5. Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Εφαρμογές των Εξωσωμάτων: Προοπτικές και Πρόοδοι

Τα εξωσώματα, μικροσκοπικά κυστίδια που εκκρίνονται από τα κύτταρα, έχουν αναγνωριστεί για τις σημαντικές δυνατότητές τους στη διαγνωστική ιατρική και στη στοχευμένη θεραπεία, καθώς περιέχουν μια ποικιλία βιολογικών μορίων, όπως RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, τα οποία παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των κυττάρων που τα παράγουν (Chen et al., 2024). Αυτά τα μικροσκοπικά σωματίδια καθιστούν δυνατή τη διάγνωση ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες και οι νευρολογικές διαταραχές, ενώ συμβάλλουν στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου και της αντίδρασης στις θεραπείες. Χάρη στην ικανότητά τους να αντανakλούν την παθολογική κατάσταση των κυττάρων, τα εξωσώματα αποτελούν εξαιρετικούς βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και τη συνεχιζόμενη παρακολούθηση της εξέλιξης των ασθενειών (Saggar et al., 2021) .

Όσον αφορά τη θεραπεία, τα εξωσώματα παρουσιάζουν μια υποσχόμενη προοπτική για τη στοχευμένη παράδοση φαρμάκων και γονιδίων, μειώνοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Η ικανότητά τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς τα καθιστά ιδανικούς φορείς για τη μεταφορά θεραπευτικών μορίων. Οι κλινικές δοκιμές που εξετάζουν τη χρήση εξωσωμάτων για την θεραπεία καρκίνου, νευρολογικών ασθενειών και καρδιοπαθειών έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα, ενισχύοντας την αξία τους ως εργαλεία για την εξατομικευμένη ιατρική (Thakur & Kaur, 2022). Εξωσώματα φορτωμένα με micro-RNA ή φαρμακευτικά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων και την ακριβή παράδοση θεραπευτικών παραμέτρων. Παρά τις υποσχόμενες δυνατότητες τους, απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες για την πλήρη αξιολόγηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας τους ως θεραπευτικά εργαλεία. Η συνεχιζόμενη έρευνα για την ανάπτυξη τεχνολογιών που θα βελτιώσουν την παραγωγή και ειδίκευση των εξωσωμάτων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές στην ιατρική (Lener et al., 2015).

1.6. Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά

Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια που υπάρχουν σε διάφορα βιολογικά υγρά, που χρησιμεύουν ως κρίσιμοι μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας και αντανακλούν τις φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις των κυττάρων προέλευσής τους. Το αίμα, συμπεριλαμβανομένου του πλάσματος και του ορού, είναι μια πλούσια πηγή εξωσωμάτων που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, καθιστώντας το επίκεντρο για μελέτες βιοδεικτών σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και ο διαβήτης (Théry et al., 2002). Τα ούρα περιέχουν εξωσώματα από κύτταρα που επενδύουν το ουροποιητικό σύστημα και τα νεφρά, προσφέροντας πολύτιμες γνώσεις για τη λειτουργία των νεφρών και τις ασθένειες που σχετίζονται με το ουροποιητικό σύστημα (Pisitkun et al., 2004). Ομοίως, το σάλιο περιλαμβάνει εξωσώματα από τους σιελογόνους αδένες και τα στοματικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία μελετώνται ολοένα και περισσότερο για τη δυνατότητά τους στη διάγνωση στοματικών και συστηματικών ασθενειών (Yáñez-Mó et al., 2015). Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) περιέχει εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων και των νευρογλοιακών κυττάρων, και είναι απαραίτητο για την έρευνα νευρολογικών διαταραχών όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Kalluri & LeBleu, 2020). Τα εξωσώματα στο μητρικό γάλα είναι πλούσια σε μόρια και θρεπτικά συστατικά που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσία του βρέφους και στην ανάπτυξη του εντέρου, ενώ αυτά στο αμνιακό υγρό συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εμβρύου και στη

διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό, που περιέχει εξωσώματα από κύτταρα στην αναπνευστική οδό και τις κυψελίδες, μελετάται για τη σχέση του με ασθένειες που σχετίζονται με τους πνεύμονες όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και οι λοιμώξεις. Το αρθρικό υγρό περιέχει εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα του χόνδρου και της αρθρικής μεμβράνης, καθιστώντας τα κρίσιμα στην έρευνα για την αρθρίτιδα και τους τραυματισμούς των αρθρώσεων. Τέλος, το σπερματικό υγρό, το οποίο περιέχει εξωσώματα από την ανδρική αναπαραγωγική οδό, είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της λειτουργίας του σπέρματος και της ανδρικής γονιμότητας. Η ποικίλη παρουσία εξωσωμάτων σε όλα αυτά τα υγρά υπογραμμίζει τη σημασία τους στη διάγνωση, τη θεραπευτική προσέγγιση και τη μελέτη διαφόρων βιολογικών διεργασιών και παθολογικών καταστάσεων (Kalluri & LeBleu, 2020).

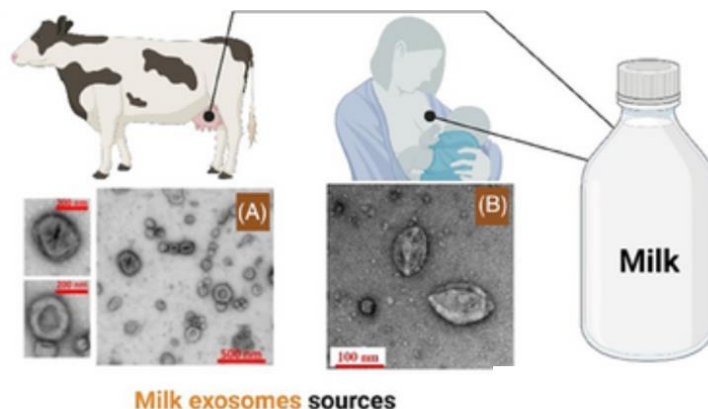
1.7. Παρουσία των εξωσωμάτων στο γάλα

Η γαλουχία στα πρόβατα διακρίνεται σε τρία βασικά στάδια: το πρωτόγαλα (colostrum), το στάδιο θηλασμού (lactation) και το στάδιο απογαλακτισμού (weaning). Το πρωτόγαλα παράγεται τις πρώτες 24–72 ώρες μετά τον τοκετό και είναι πλούσιο σε ανοσοσφαιρίνες, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα βιοδραστικά μόρια που προσφέρουν ανοσολογική προστασία και ενίσχυση της εντερικής ανάπτυξης του νεογνού. Ακολουθεί το κυρίως γάλα του θηλασμού, το οποίο χαρακτηρίζεται από σταθερότερη σύσταση σε θρεπτικά συστατικά και εξυπηρετεί τη συνεχή ανάπτυξη. Τέλος, το γάλα κατά το στάδιο του απογαλακτισμού εμφανίζει μεταβολές στη σύνθεση καθώς μειώνεται σταδιακά η παραγωγή και το νεογνό μεταβαίνει σε στερεά τροφή. Κάθε στάδιο φέρει μοναδικά χαρακτηριστικά που αντανακλώνται και στο προφίλ των εξωσωμάτων που περιέχονται στο γάλα (Connolly et al., 2023).

Τα εξωσώματα έχουν εντοπιστεί σε διάφορους τύπους γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων και πολλών ζωικών πηγών. Το ανθρώπινο μητρικό γάλα, ειδικά το πρωτόγαλα, είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε εξωσώματα που περιέχουν βιοενεργά μόρια όπως micro-RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού, την εντερική ωρίμανση και τη συνολική υγεία των βρεφών (Liao et al., 2017). Τα εξωσώματα που προέρχονται από το γάλα (Milk Derived Exosomes, MDEs) είναι από τα πιο σημαντικά μόρια σηματοδότησης που μεσολαβούν στην κυτταρική επικοινωνία μεταξύ μιας μητέρας και των απογόνων της (Sedykh et al., 2020). Το βόειο γάλα είναι μια άλλη σημαντική πηγή, η οποία έχει μελετηθεί ευρέως για την υψηλή περιεκτικότητά του σε σταθερά εξωσώματα που μπορούν να επιβιώσουν στην πέψη και να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων στους καταναλωτές, καθιστώντας τους υποσχόμενους υποψήφιους για θεραπευτικά συστήματα χορήγησης (Zempleni et al., 2019) (Munagala et al., 2016). Το κατσικίσιο και το βουβαλίσιο γάλα περιέχουν επίσης εξωσώματα με παρόμοια προφίλ, αν και έχουν ερευνηθεί λιγότερο εκτενώς. Τα εξωσώματα του κατσικίσιου γάλακτος

πιστεύεται ότι έχουν ανοσοτροποποιητικό δυναμικό, ενώ τα εξωσώματα του βουβαλίσσιου γάλακτος διαθέτουν βιοενεργά RNA και πρωτεΐνες που μπορεί να υποστηρίξουν την υγεία. Πιο πρόσφατα, το γάλα καμήλας έχει αναδειχθεί ως μια νέα πηγή εξωσωμάτων, με πρώιμες μελέτες να υποδηλώνουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ευρεία παρουσία και το ποικίλο βιολογικό δυναμικό των εξωσωμάτων που προέρχονται από γάλα σε όλα τα είδη.

Τα εξωσώματα που προέρχονται από γάλα έχουν γίνει σημαντικό ερευνητικό αντικείμενο μελέτης λόγω της φυσικής τους προέλευσης, της βιοσυμβατότητας και της ικανότητάς τους να μεταφέρουν βιοενεργά μόρια όπως microRNA, mRNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Η αντοχή τους σε σκληρές γαστρεντερικές συνθήκες τους επιτρέπει να χρησιμεύουν ως φυσικοί νανοφορείς ικανοί να μεταφέρουν λειτουργικά μόρια σε απομακρυσμένους ιστούς (Wolf et al., 2023). Οι ερευνητές διερευνούν τη χρήση τους ως θεραπευτικά μέσα χορήγησης για φάρμακα, νουκλεϊκά οξέα και μικρά μόρια, επειδή είναι ασφαλέστερα και πιο εύκολα αποδεκτά από τον οργανισμό σε σύγκριση με τα συνθετικά νανοσωματίδια (Munagala et al., 2016). Επιπλέον, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση εξωσωμάτων γάλακτος ως βιοδείκτες για ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της μαστίτιδας σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και ενδεχομένως για ανθρώπινες παθήσεις μέσω μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων. Τα εξωσώματα του γάλακτος επιτρέπουν επίσης τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο τα διατροφικά συστατικά επηρεάζουν την επιγενετική ρύθμιση, καθώς πολλά από τα RNA που φέρουν είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα σε επίπεδο χρωματίνης ή mRNA (Zempleni et al., 2019). Η παρουσία τους σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης όπως το αγελαδινό γάλα τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικά για την ανάπτυξη από του στόματος θεραπευτικών στρατηγικών και για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της γονιδιακής διατροφής τόσο σε βρέφη όσο και σε ενήλικες. Συνολικά, τα εξωσώματα γάλακτος χρησιμεύουν ως ένα πλούσιο και προσβάσιμο σύστημα για βιοχημικές έρευνες τόσο στη θεμελιώδη κυτταρική βιολογία όσο και στις εφαρμογές της βασικής έρευνας στην ιατρική, τη θεραπεία και τη διατροφή.



Εικόνα 6: Συνοπτική απεικόνιση πηγών παραγωγής των εξωσωμάτων από το γάλα. Α) Εξωσώματα ζωικής προέλευσης και Β) Εξωσώματα ανθρώπινης προέλευσης. Τροποποίηση από Milk exosomes: Harnessing nature's duality for cancer therapy Asmit Das, Swarup Sonar, Ketki Kalele, Vetriselvan Subramaniyan (Das et al., 2024)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής διαδικασίας είναι η αναγνώριση εξωσωματικών δεικτών με στόχο την ευρύτερη κατανόηση του ρόλου των εξωσωμάτων στην αλληλεπίδραση μητέρας-νεογνού μέσω των μηνυμάτων που μεταφέρουν τα εξωσώματα ανάλογα με το περιεχόμενό τους. Ειδικότερα, μελετήθηκαν δείγματα γάλακτος από πρόβατα τα οποία συλλέχτηκαν σε τρεις φάσεις γαλουχίας: πρωτόγαλα (Colostrum), θηλασμού (Lactation) και απογαλακτισμού (Weaning). Τα δείγματα προήλθαν από το εργαστήριο Ζωοτεχνίας - Εκτροφής Μηρυκαστικών Ζώων του ΠΘ. Η μελέτη των εξωσωμάτων έγινε σε τρία επίπεδα: πρωτεϊνικό επίπεδο, επίπεδο mRNA και μικροσκοπική παρατήρηση.

3.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αντιδραστήρια

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Agarose	SIGMA
Ammonium Persulfate (APS)	Applichem
Blotting paper	Whatman
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka

DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycerol	Applichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Isopropanol	SIGMA
Methanol	SIGMA
N'N' methylene- bis Acrylamide	SERVA
NP-40	Applichem
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Ponceau S	Applichem
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
Protease Inhibitor Cocktail Set X	Calbiochem
PVDF membrane	Macherey-Nagel
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium Deoxycolate	Serva
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich
Tris Base	Applichem

Triton-X 100	Merck
Glutaraldehyde	Sigma
Paraformaldehyde	Sigma
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën

3.2. KITS

Πίνακας 2. KITS

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
exoEasy Maxi Kit	Qiagen
exoRNeasy Midi Kit	Qiagen
KAPA SYBR® FAST	Roche

3.3. Δείκτες μοριακών μαζών

Πίνακας 3. Δείκτες Μοριακών Μαζών

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
--------------------------------------	---------------------------

Διαλύματα:

❖ Διαλυμα για την απομόνωση εξωσωμάτων:

- PBS 1x: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM pH στο 7,4

❖ Διαλύματα για τη δημιουργία της πηκτής πολυκαρυλαμιδίου:

- Πηκτή διαχωρισμού (Seperating gel): 10 % w/v και 12 w/v πολυακρυλαμιδίου

Πηκτή διαχωρισμού (Seperating gel)		
	10%	12%
dH ₂ O	1,9 ml	1,6 ml
30% w/v acrylamide mix	1,7 ml	2.0 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,3 ml	1.3 ml
10% w/v SDS	50 μl	50 μl
10% w/v ammonium persul- fade (APS)	50 μl	50 μl
TEMED	2 μl	2 μl

- Πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel): 5% πολυακρυλαμιδίου

Πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel)	
	5%
dH ₂ O	3,4 ml
30% w/v acrylamide mix	830 μl
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	630 μl
10% w/v SDS	50 μl
10% w/v ammonium persul- fade (APS)	50 μl
TEMED	2 μl

❖ Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (10x): Tris 1,5% w/v, Γλυκίνη 7,2% w/v, SDS 0,5% w/v, pH 8,3. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με αραίωση κατά 10 φορές του παραπάνω διαλύματος (1x).
- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4x (Sample Buffer): Tris-HCl 240mM pH 6,8, Glycerol 40%, SDS 8%, β- mercaptoethanol 5%, Bromophenol Blue 0,04 % w/v.
- Μίγμα ακρυλαμιδίου 30% w/v (ακρυλαμίδιο/ bis-ακρυλαμίδιο) : 29/1

❖ Διαλύματα για την ανοσοαποτύπωση κατά Western σε μεμβράνη PVDF:

- Χρώση της μεμβράνης PVDF με Ponceau S: 0.1% Ponceau S w/v σε 1% v/v οξικό οξύ
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 10× : Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1% w/v , MeOH 10% v/v

❖ Διάλυμα για την ανοσοανίχνευση των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF:

- Διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer): 5% Άπαχο γάλα σε σκόνη σε TBS-T
- TBS-T: 0,1% Tween 20 σε TBS 1×
- TBS 10×: Tris-base 2,4% w/v, NaCl 8,8 w/v

❖ Διάλυμα για την αποσύνδεση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη PVDF (Stripping buffer):

- Stripping buffer: για 100mL buffer χρειάζονται: Glycine 1,5% w/v, SDS 0,1% w/v, Tween 20 1% v/v, pH 2,2.
- Η μεμβράνη επώάζεται δύο φορές επί 5 λεπτά στο Stripping buffer υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί διπλή έκπλυση με διάλυμα PBS, διάρκειας 10 λεπτών έκαστη. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δύο επιπλέον πλύσεις με διάλυμα PBS-T, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία. Τέλος, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε μεθανόλη για 20–30 δευτερόλεπτα, ώστε να ενεργοποιηθεί.

3.4. Υλικά-Οργανολογία

Ο απαιτούμενος εξοπλισμός και τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ήταν διαθέσιμα τόσο στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας όσο και στους κοινόχρηστους εργαστηριακούς χώρους του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Παρακάτω παρατίθενται τα κυριότερα εξ αυτών:

Πίνακας 4. Όργανα

Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf, Nichiryo
-------------------	-----------------------------

Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης mini-PROTEAN tetracell	Biorad
Μετρητής pH	Metrohm
Whatman 3mm paper	Whatman
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς Yrdimes Semi-dry Blotter	Wealtec
Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους UV 1600-PC	VWR
Nanodrop	Thermo Scientific
Plate reader Enspire	Perkin Elmer
StepOnePlus Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific
Φυγόκεντροι	Eppendorf, Hermle
Φίλτρα 0,22 µm PES	Millipore
Φίλτρα 0,45 µm PES	Millipore

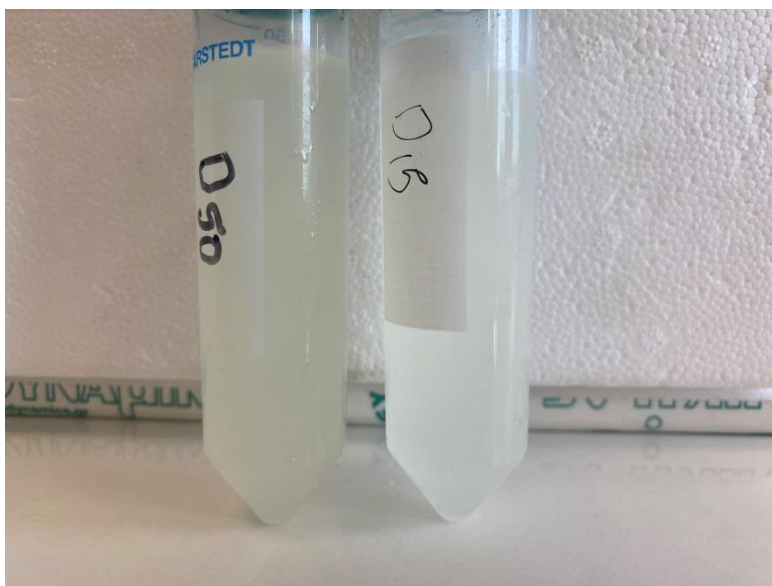
3.5. Αντισώματα:

Πίνακας 5. Αντισώματα

Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG)	Pierce Biotechnology
Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG)	Pierce Biotechnology
Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CD9	Sigma-Aldrich
Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης TSG101	Sigma-Aldrich

3.6. Προκαταρκτικός Καθαρισμός Δειγμάτων Γάλακτος

1. Αραίωση δείγματος (18ml) με PBS 30 ml (3:1).
2. Φυγοκέντρηση στα 4000g/ 15' / 4°C, για καθίζηση των κυττάρων.
3. Λήψη υπερκείμενου (με αποστειρωμένη πιπέτα) και αραίωση σε ίσο όγκο 0,25M EDTA, pH 7, προς καθίζηση της καζεΐνης, αποδεσμεύοντας το ασβέστιο από το σύμπλοκο (με ογκομετρικούς σωλήνες).
4. Επώαση για 15 min καλυμμένα με πάγο.
5. Φυγοκέντρηση στα 12.000g / 1h / 4°C, για καθίζηση λιποσφαιρίων και απομάκρυνση αυτών.
6. Λήψη υπερκείμενου.
7. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο Falcon.
8. Φυγοκέντρηση σε 22.500g / 1h / 4°C (χρήση μιας σπάτουλας ή ενός μικρού εργαστηριακού κουταλιού για την αφαίρεση του στρώματος λίπους).
9. Φιλτράρισμα με 0,45 μm PES.
10. Φιλτράρισμα με 0,22 μm PES.



Εικόνα 7. Δείγματα γάλακτος μετά από την διαδικασία προκαθαρισμού.

3.7. Πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων από δείγματα γάλακτος :

Η απομόνωση εξωσωμάτων έγινε με χρήση kit Qiagen. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

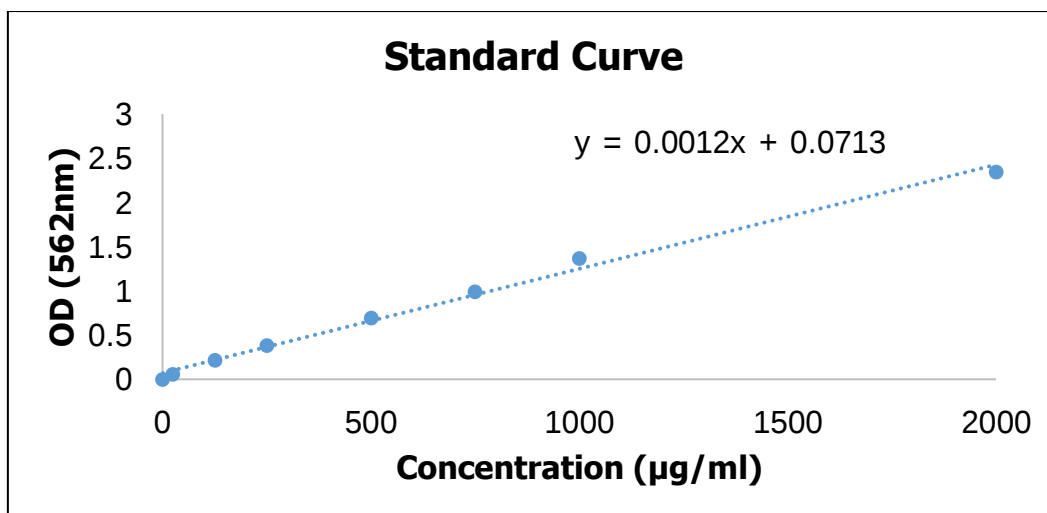
1. Προσθήκη 1:1 αναλογία XBP σε δείγμα (8 ml XBP buffer σε 8 ml δείγματος). Καλή

- ανάμιξη αναστρέφοντας το σωλήνα 5 φορές.
2. Αφήνω το δείγμα σε θ° δωματίου.
 3. Προσθέτω το μείγμα στην στήλη και φυγοκεντρώ σε 500 g για ένα λεπτό.
 4. Απορρίπτω αυτό που έχει βγει από τη ροή και τοποθετώ τη στήλη πίσω στον ίδιο σωλήνα.
 5. Για απομάκρυνση υπολειμματικού υγρού φυγοκεντρούμε στα 5000 g / 1 min.
 6. Προσθέτω 10ml buffer XWP και φυγοκεντρώ στα 5000g / 5 min.
 7. Μεταφέρω τη στήλη σε σωλήνα συλλογής.
 8. Προσθέτω 250μl buffer ΧΕ στην μεμβράνη και επωάζω για 1 λεπτό.
 9. Φυγοκεντρώ στα 500 x g για 5 λεπτά.
 10. Συλλέγουμε το περιεχόμενο που εκλύεται.

3.8. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών δειγμάτων εξωσωμάτων

Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση του kit Pierce BCA Protein Assay Kit. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 562 nm με τη χρήση του Plate Reader. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματα που μελετήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία έγινε με βάση μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 562 nm.

Standard curve		
Tube	Concentration (μg/ml)	Absorbance (562nm)
1	2000	2,3475
2	1000	1,3685
3	750	0,987
4	500	0,693
5	250	0,383
6	125	0,215
7	25	0,0565
8	0	0



Εικόνα 8. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 562 nm.

3.9. Ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μια τεχνική που περιλαμβάνει αρκετά διαφορετικά βήματα και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα σύνθετο πρωτεϊνικό μείγμα που προέρχεται από κύτταρα, ιστούς ή βιολογικά υγρά, αναδεικνύοντας επίσης το μοριακό της βάρος. Αρχικά, οι πρωτεΐνες στο δείγμα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ακολούθως μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (είτε νιτροκυτταρίνης είτε PVDF) χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό ρεύμα. Το τελικό βήμα περιλαμβάνει την ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου μέσω επώασης με πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.

3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE)

Το SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η θεμελιώδης αρχή βασίζεται στη μετανάστευση φορτισμένων μορίων όταν εκτίθενται σε ηλεκτρικό πεδίο. Σε αυτή τη διαδικασία, οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε επεξεργασία πρώτα με ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli, το οποίο περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS διαταράσσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, επικαλύπτοντάς τις με αρνητικό φορτίο και δημιουργώντας μια ομοιόμορφη αναλογία φορτίου προς μάζα. Αυτό επιτρέπει στις πρωτεΐνες να κινηθούν προς την άνοδο (θετικό φορτίο) κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, με τη μετακίνησή τους να καθορίζεται αποκλειστικά από το μέγεθός τους και όχι από το φορτίο ή το σχήμα τους. Η β-μερκαπτοαιθανόλη διασπά περαιτέρω τους

δισουλφιδικούς δεσμούς, καταστρέφοντας την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποτρέποντας οποιαδήποτε αναδίπλωση, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με θερμική επεξεργασία στους 95°C για περίπου 5 λεπτά.

Στο SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους καθώς κινούνται μέσω μιας πηκτής πολυακρυλαμίδιου. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες βιώνουν μεγαλύτερη τριβή και έτσι μεταναστεύουν πιο αργά, παραμένοντας πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης. Οι μικρότερες πρωτεΐνες, αντίθετα, κινούνται πιο γρήγορα. Αυτός ο διαχωρισμός διευκολύνεται από ένα ασυνεχές σύστημα πηκτής, το οποίο τυπικά περιλαμβάνει δύο διακριτές στρώσεις: μια πηκτή επιστοίβαξης (συνήθως 5% ακρυλαμίδιο) και μια πηκτή διαχωρισμού (με συγκεντρώσεις ακρυλαμίδιου που κυμαίνονται από 8% έως 15%). Η πηκτή επιστοίβαξης διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο διαχωριστικό πήκτωμα ταυτόχρονα, δημιουργώντας ένα καθαρό, ενιαίο μέτωπο για αποτελεσματικό διαχωρισμό. Ο πολυμερισμός της πηκτής ξεκινά με υπερθειικό αμμώνιο (APS) και καταλύεται από N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), σχηματίζοντας ένα πλέγμα ακρυλαμίδιου και bis-ακρυλαμίδιου σε θερμοκρασία δωματίου.

Μόλις πολυμεριστεί, η πηκτή τοποθετείται σε έναν κατακόρυφο θάλαμο ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1× για να εξασφαλιστεί η αγωγιμότητα. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται σε φρεάτια στην πηκτή, με δείκτη μοριακού βάρους σε μία από τις λωρίδες για να επιτρέπεται η σύγκριση μεγέθους. Χρησιμοποιώντας μια σταθερή τάση (συνήθως 80-140 V), το ηλεκτρικό πεδίο οδηγεί τις πρωτεΐνες μέσω της πηκτής. Μετά την ολοκλήρωση της τεχνικής, οι πρωτεΐνες μπορούν να οπτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας μεθόδους χρώσης όπως το Coomassie Brilliant Blue ή να μεταφερθούν σε μια μεμβράνη για περαιτέρω ανάλυση, όπως το Western blotting.

3.11 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF

Αφού οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με SDS-PAGE, μεταφέρονται από την πηκτή σε μια μεμβράνη PVDF (φθοριούχο πολυβινυλιδένιο) ή νιτροκυτταρίνη μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ηλεκτρομεταφορά. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο αρνητικό φορτίο των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-SDS, τα οποία, όταν υποβάλλονται σε ηλεκτρικό πεδίο, μεταναστεύουν προς την άνοδο. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετανάστευσης, οι πρωτεΐνες εξέρχονται από το πηκτή και στερεώνονται στη μεμβράνη μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Για να διευκολυνθεί αυτή η μεταφορά, η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετούνται σε μια συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, τοποθετημένα ανάμεσα σε δύο στρώσεις διηθητικού χαρτιού Whatman, εξασφαλίζοντας άμεση επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης χωρίς φυσαλίδες αέρα, καθώς αυτές μπορούν να παρεμποδίσουν τη ροή του ρεύματος και να εμποδίσουν την αποτελεσματική μεταφορά. Το σύστημα

βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και για μεμβράνες PVDF, ενώ απαιτείται ένα επιπλέον βήμα εμβάπτισης σε 100% μεθανόλη για 25–30 δευτερόλεπτα πριν τη μεταφορά τους στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η μεμβράνη είναι προσανατολισμένη προς την αρνητική πλευρά και η γέλη προς τη θετική πλευρά της συσκευής μεταφοράς.

Η διαδικασία μεταφοράς πραγματοποιείται συνήθως υπό σταθερή ένταση ρεύματος (270 mA) για 56 λεπτά, αν και ο ακριβής χρόνος μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την πυκνότητα της πηκτής. Η επιτυχία της μεταφοράς επαληθεύεται αρχικά με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S, μια χρωστική που τονίζει τις μεταφερόμενες πρωτεϊνικές ζώνες, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς.

3.12. Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι το τελικό στάδιο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών που ακινητοποιούνται στη μεμβράνη χρησιμοποιώντας αντισώματα. Η διαδικασία ξεκινά με μπλοκάρισμα (Blocking), όπου η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (διάλυμα κορεσμού γάλακτος, blocking buffer, 10% v/v) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Αυτό το βήμα αποτρέπει τη μη ειδική δέσμευση καλύπτοντας τυχόν εναπομείνουσες μη κατειλημμένες θέσεις στη μεμβράνη με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, ελαχιστοποιώντας έτσι τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με το πρωτογενές αντίσωμα.

Μετά τον αποκλεισμό, η μεμβράνη επωάζεται με ένα πρωτογενές αντίσωμα που συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη στόχο. Το πρωτογενές αντίσωμα ανιχνεύει επιτόπους της πρωτεΐνης-ενδιαφέροντος. Μετά την επώαση (συνήθως 12-16 ώρες στους 4°C), η μεμβράνη πλένεται με διάλυμα TBS-T για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος και ο αριθμός των πλύσεων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το ειδικό αντίσωμα και την πιθανή μη ειδική δέσμευση. Η μεμβράνη στη συνέχεια επωάζεται με ένα δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο όπως η υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase, HRP) που διευκολύνει τη διαδικασία ανίχνευσης.

Για να οπτικοποιηθεί η δέσμευση, χρησιμοποιείται η χημειοφωταύγεια. Σε αυτή τη μέθοδο, το HRP καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αλκαλικό περιβάλλον, εκπέμποντας φωτόνια που μπορούν να συλληφθούν σε φιλμ ακτίνων X ή να ανιχνευθούν από ένα σύστημα απεικόνισης χημειοφωταύγειας. Η ισχύς του σήματος είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης-στόχου, με τον χρόνο ανίχνευσης να κυμαίνεται από 30 δευτερόλεπτα έως 1 ώρα, ανάλογα με την ένταση του σήματος. Για να ενισχυθεί το σήμα χημειοφωταύγειας, χημικοί ενισχυτές, όπως οι φαινόλες,

χρησιμοποιούνται συχνά για την ενίσχυση της αντίδρασης και τη βελτίωση της ευαισθησίας.

3.12.1. Απομόνωση εξωσωματικού RNA από δείγματα γάλακτος

Η απομόνωση του εξωσωματικού RNA έγινε με τη χρήση του kit exoRNeasy Midi/Maxi Kit στα ήδη απομονωμένα εξωσώματα. Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 700 μ l Qiazol και spin για 5 min στα 5000x g , συλλέγοντας τελικά το κυτταρικό λύμα.
2. Ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
3. Προσθήκη 90 μ l χλωροφόρμιο και έντονη ανάδευση για 15 s.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min.
5. Φυγοκέντρηση για 15 min στα 12000g στους 4°C.
6. Μεταφορά της άνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο. Προσθήκη 2 όγκων 100% αιθανόλης. Καλή ανάδευση.
7. Πρόσθηκη 700 μ l δείγματος σε μια RNeasy MinElute spin στήλη και έπειτα φυγοκέντρηση για 15 s σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Επανάληψη του βήματος 7 για το υπολειπόμενο δείγμα.
9. Προσθήκη 700 μ l buffer RWT στη στήλη και φυγοκέντρηση για 15 s σε 8000 x g.
10. Προσθήκη 500 μ l buffer RPE στη στήλη και φυγοκέντρηση για 15 s σε 8000 x g. X2
11. Τοππθέτηση της RNeasy MinElute spin στήλης σε νέο σωλήνα και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min για να στεγνώσει η μεμβράνη.
12. Τοποθέτηση της RNeasy MinElute spin στήλης σε νέο σωλήνα και προσθήκη 14 μ l RNase-free water απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης. Επώαση για 1 min και έπειτα φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για να εκλυστεί το RNA.

3.12.2.Σύνθεση cDNA για ανάλυση επιπέδων έκφρασης miRNA με qPCR

Η σύνθεση του cDNA από το RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα γάλακτος επιτυγχάνεται με τη χρήση του kit 1st strand cDNA kit της TAKARA.

1. Στο πρώτο στάδιο παρασκευάζεται το παρακάτω μείγμα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Random Hexamers (Τυχαία εξαμερή)	2 μ l
NTPs Mix (Μείγμα Νουκλεοτιδίων)	1 μ l

Συνολικό RNA	2000 nanograms
RNAse free H ₂ O	Συμπλήρωση μέχρι τελικό όγκο 10 μl

- Επώαση για 50 λεπτά στους 65 °C στον θερμοκυκλοποιητή για την πρόσδεση των τυχαίων εξαμερών στα microRNA.
- Στο επόμενο στάδιο παρασκευάζεται το εξής μείγμα συνολικού όγκου 20 μl

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Template Primer Mix (Δείγμα προς ενίσχυση)	10 μl
5X Buffer	4 μl
Αναστολέας RNAσών	0,5 μl
Αντίστροφη Μεταγραφάση	1 μl
RNAse free H ₂ O	4,5 μl

- Επώαση για 10 λεπτά στους 50°C στον θερμοκυκλοποιητή με σκοπό την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής
- Επώαση για 15 λεπτά στους 70 °C στον θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

3.13. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η Real Time PCR μία από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Πρόκειται για μία τεχνική που προτιμάται λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, καθώς και λόγω της ικανότητά της να ανιχνεύει ακόμη και ένα μόνο μετάγραφο μέσα στο αντιδρόν μείγμα. Παράλληλα, η RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative PCR) διακρίνεται και για την εξειδίκευσή της, εφόσον έχει επιτευχθεί ο σωστός σχεδιασμός των εκκινήτων. Η διαδικασία της RT-qPCR μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα στάδιο, όπου η σύνθεση του cDNA (complementary DNA) και η ενίσχυση μέσω PCR πραγματοποιούνται στο ίδιο μείγμα, είτε σε δύο στάδια, με την αντίστροφη μεταγραφή και την PCR να διεξάγονται ως διακριτές διαδικασίες.

Κατά την RT-qPCR, η εκθετική αύξηση των προϊόντων PCR συνοδεύεται από αντίστοιχη ενίσχυση του φθορισμού, ο οποίος καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο από το μηχάνημα της qPCR. Η μέτρηση αυτής της αύξησης επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας του DNA στόχου. Στα πρώτα στάδια της PCR, η συγκέντρωση του προϊόντος είναι χαμηλή, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να μην ανιχνεύεται από το σύστημα. Καθώς προχωρά η αντίδραση, εισέρχεται στην εκθετική φάση, κατά την οποία το προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο και ο φθορισμός αυξάνεται. Όσο περισσότερα είναι τα αρχικά μόρια στόχοι στο υπόστρωμα cDNA, τόσο πιο γρήγορα εισέρχεται η αντίδραση στην εκθετική φάση, και τόσο νωρίτερα ανιχνεύεται φθορισμός. Η σύγκριση του αριθμού των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση του φθορισμού (cycle threshold - Ct) επιτρέπει την εκτίμηση και σύγκριση της αρχικής ποσότητας των μορίων στόχων στα διαφορετικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε two-step RT-qPCR με τη χρωστική SYBR® Green. Το SYBR Green προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA και, όταν προσδεθεί, ενισχύεται η φθορίζουσα έντασή της.

Για την ελαχιστοποίηση των πιθανών σφαλμάτων, κάθε πειραματική αντίδραση (όλα τα δείγματα γάλακτος) εκτελείται σε triplicates (δηλαδή, το ίδιο δείγμα τοποθετείται σε τρία ξεχωριστά wells). Παράλληλα, για την ορθή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, μετράται επίσης η έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene, U6 snRNA) σε τριπλέτα. Επιπλέον, για κάθε τριπλέτα συμπεριλαμβάνεται και αρνητικός μάρτυρας (NTC – No Template Control), στον οποίο απουσιάζει το DNA-υπόστρωμα, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα επιμολύνσεων ή μη ειδικής ενίσχυσης. Κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων, κάθε δείγμα περιλαμβάνει τη φθορίζουσα ουσία SYBR® Green, τους εκκινητές (forward και reverse primers), το cDNA και RNase-free απιονισμένο νερό, με τελικό όγκο αντιδραστήριου 20 µL ανά δείγμα.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (µl)
Template Primer Mix (Δείγμα DNA προς ενίσχυση)	10 µl
Forward Primer (100 mM)	0.4 µl
Reverse Primer (100 mM)	0.4 µl
cDNA	2 µl
RNase free H ₂ O	7.2 µl

Έπειτα, τα δείγματα εισάγονται στο θερμικό κυκλοποιητή **StepOnePlus Real-Time PCR System**. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

- ❖ **Holding Stage:** αρχική φάση όπου αποδιατάσσονται τα δίκλινα μόρια DNA και απενεργοποιούνται τα ένζυμα (νουκλεάσες) μέσω αυξημένης θερμοκρασίας.
- ❖ **Cycling Stage:** πραγματοποιείται η ενίσχυση και ποσοτικοποίηση των στόχων.
- ❖ **Melt Curve Stage:** ανάλυση της καμπύλης τήξης, η οποία αποκαλύπτει τυχόν επιμολύνσεις ή μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης.

Αναλυτικά τα βήματα της RT-qPCR:

Στάδιο	Κύκλοι	Βήματα
Holding Stage	1	50 °C για 10 λεπτά
		95 °C για 2 λεπτά
Cycling Stage	40	95 °C για 15 δευτερόλεπτα
		60 °C για 40 δευτερόλεπτα
Melt Curve Stage	1	95 °C για 15 δευτερόλεπτα
		60 °C για 1 λεπτό
		Σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας κατά 0,3 °C
		95 °C για 15 δευτερόλεπτα

Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις RT-qPCR της διατριβής:

miR-26: Forward :5' CTCCTCGCTTCAAGTAATCCA3'
 Reverse : 5' TATGCTTGTCTCGTCTCTGTGTC 3'

3.14. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης –TEM

Η TEM είναι η πιο αποτελεσματική διαδικασία για την εξέταση της μορφολογίας και της δομής των εξωσωμάτων λόγω της ικανότητάς της να ανιχνεύει εξωσώματα μικροσκοπικού μεγέθους. Η διαδικασία αρνητικής χρώσης είναι απλή και γρήγορη, διαρκεί μόνο λίγες ώρες, και η ανάλυση για την TEM είναι περίπου 1 nm. Τα εξωσώματα μπορούν να εξεταστούν με τη χρήση κανονικής TEM για (1) την επιβεβαίωση της παρουσίας τους στο διάλυμα, (2) την αξιολόγηση της ποιότητάς τους και (3) την εξέταση της μορφολογίας τους. Η TEM λειτουργεί με τις ίδιες θεμελιώδεις έννοιες όπως και το μικροσκόπιο φωτός, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια αντί για φως. Εκθέτοντας ένα μικροσκοπικό στρώμα ενός δείγματος σε μια δέσμη ηλεκτρονίων, οι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί μπορούν να

ανιχνεύσουν τον τρόπο με τον οποίο τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται, δημιουργώντας ένα μοτίβο περίθλασης που μπορεί να αποτυπωθεί ως μεγεθυμένη εικόνα (Dilsiz, 2024).

3.14.1. Προετοιμασία δειγμάτων για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης

Η προετοιμασία δειγμάτων περιλαμβάνει τη δημιουργία grids. Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Ανασύσταση 100000 x g pellet που περιέχει εξωσώματα σε 50 μl 4% PFA.
2. Τοποθέτηση 5 μl σε carbon-coated EM grids.
3. Σε ένα καθαρό parafilm τοποθέτηση σταγόνων 100 μl PBS και μεταφορά των grids στις σταγόνες PBS για πλύση.
4. Μεταφορά των grids σε 50μl σταγόνα από 1% γλουταραλδεΐδη για 5 λεπτά.
5. Μεταφορά σε 100 μl σταγόνα απιονισμένου νερού για δύο λεπτά. Επανάληψη 7 φορές για 8 συνολικά πλύσεις.

4.Αποτελέσματα

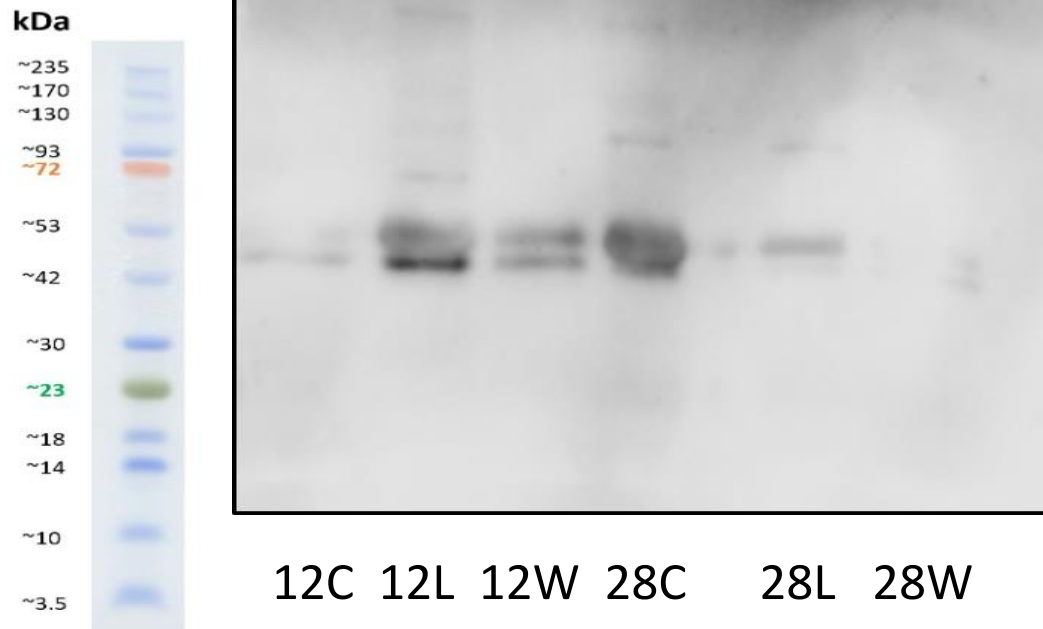
Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορούν την ανίχνευση εξωσωματικών δεικτών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριών κύριων τεχνικών: Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot), Ποσοτική PCR (qPCR) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (TEM). Μέσω των παραπάνω μεθόδων, καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν τα ευρήματα που σχετίζονται με την έκφραση των εξωσωματικών δεικτών και τη μορφολογία των εξωσωμάτων, όπως αποτυπώνονται στις παρακάτω εικόνες και διαγράμματα.

4.1. Έλεγχος Επιτυχούς Απομόνωσης και Πρωτεϊνικής Ταυτοποίησης Εξωσωμάτων μέσω Western Blot

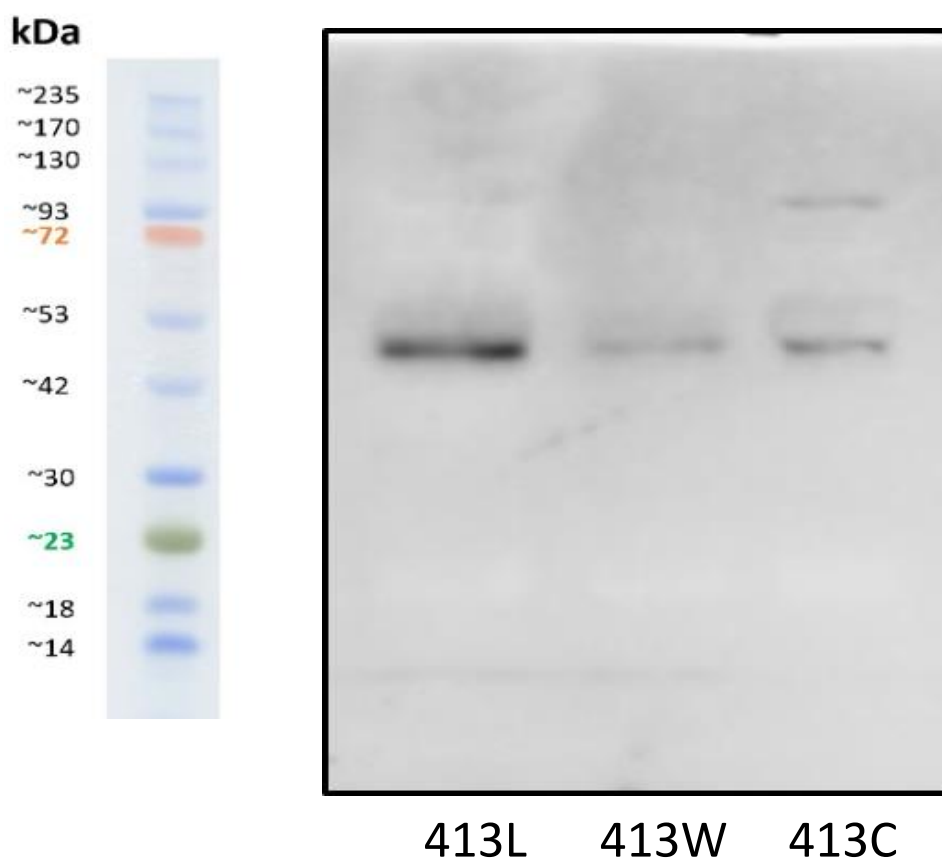
Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης εξωσωμάτων από τα δείγματα γάλακτος (πρωτογάλακτος, γάλα θηλασμού και απογαλακτισμού), χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η ανίχνευση των εξωσωματικών δεικτών TSG101 και CD9 αποτέλεσε δείκτη της παρουσίας των εξωσωμάτων στα απομονωμένα σωματίδια. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF, οι οποίες επώαστηκαν με ειδικά αντισώματα. Η ανίχνευση έντονων ζωνών στα αναμενόμενα μοριακά βάρη των TSG-101 και CD9 επιβεβαίωσε την ύπαρξη εξωσωματικών πρωτεϊνών σε όλα τα στάδια της γαλουχίας, υποδεικνύοντας την επιτυχή

απομόνωση και καθαρότητα των εξωσωμάτων από τα διαφορετικά δείγματα γάλακτος. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην ένταση των ζωνών, οι οποίες ενδεχομένως σχετίζονται με τη διακύμανση της συγκέντρωσης των εξωσωμάτων ανάλογα με το στάδιο γαλουχίας.

A



B



[34]

Γ

kDa

~235

~170

~130

~93

~72

~53

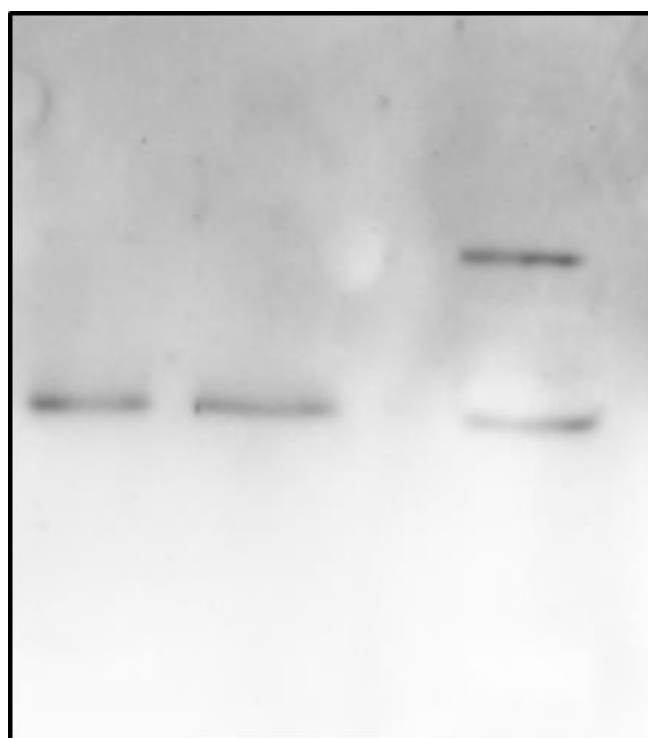
~42

~30

~23

~18

~14



453C

453L

453W

Εικόνα 9: Δείγματα γάλακτος από πρωτογάλα, θηλασμό και απογαλακτισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία του δείκτη εξωσωμάτων TSG101. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της TSG101, επιβεβαιώνοντας την παρουσία εξωσωματικών πρωτεϊνών στα αντίστοιχα δείγματα. Αριστερά σε όλες τις εικόνες παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός δείκτης γνωστών μοριακών βαρών.

kDa

~235

~170

~130

~93

~72

~53

~42

~30

~23

~18

~14

~10



12C

12L

12W

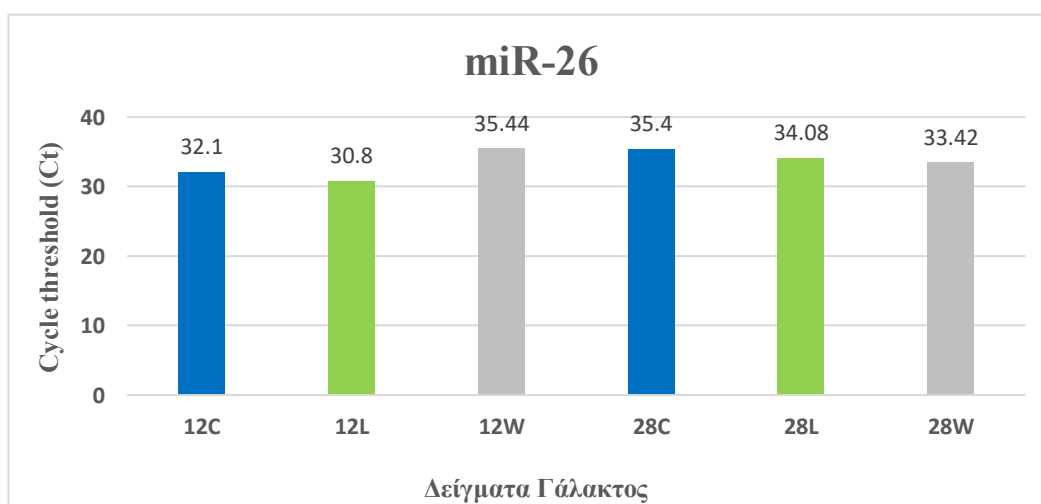
Εικόνα 10: Δείγματα γάλακτος από πρωτογάλα, θηλασμό και απογαλακτισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF και μελετήθηκαν ως προς

την παρουσία του δείκτη εξωσωμάτων CD9. Οι μεμβράνες επώστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της CD9, επιβεβαιώνοντας την παρουσία εξωσωματικών πρωτεϊνών στα αντίστοιχα δείγματα. Αριστερά παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός δείκτης γνωστών μοριακών βαρών.

4.2. Ποσοτική PCR (qPCR) για την ανίχνευση του εξωσωματικού miR-26

Για την επιβεβαίωση της εξωσωματικής προέλευσης του γενετικού υλικού, εφαρμόστηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) για την ανίχνευση του miR-26 σε εξωσωματικά κλάσματα από δείγματα γάλακτος πρωτογάλακτος, θηλασμού και απογαλακτισμού. Το RNA απομονώθηκε από τα εξωσώματα και μετατράπηκε σε cDNA, ενώ ως ενδογενής έλεγχος χρησιμοποιήθηκε το U6 snRNA. Το miR-26 αποτελεί microRNA με σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις, και έχει αναφερθεί ότι μεταφέρεται μέσω εξωσωμάτων (Yu et al., 2022). Η ανίχνευσή του σε όλα τα δείγματα επιβεβαιώνει την παρουσία εξωσωματικού RNA, ενώ οι διαφορές στους κύκλους ανίχνευσης (Ct) υποδηλώνουν πιθανές μεταβολές στην ποσότητα του συγκεκριμένου microRNA ανάλογα με το στάδιο γαλουχίας, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα εξωσώματα διαδραματίζουν ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ μητέρας και νεογνού.

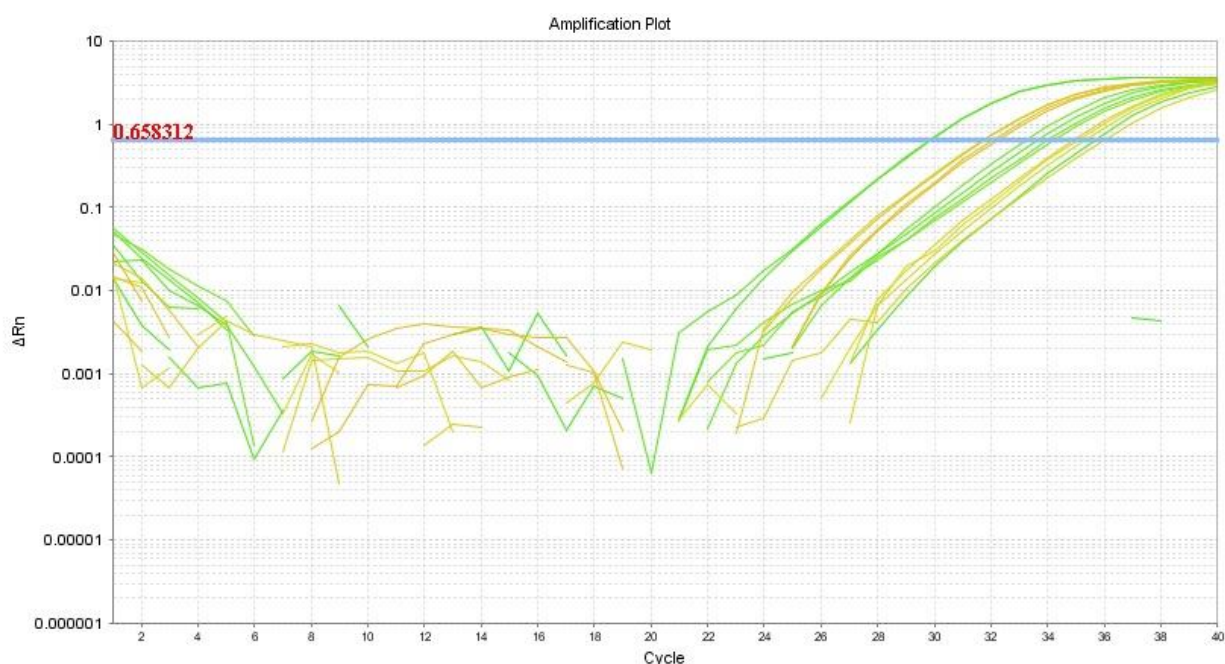
Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της qPCR, το γενετικό πρότυπο ενισχύεται κυκλικά, προκαλώντας προοδευτική αύξηση του φθορισμού. Η τιμή του κύκλου κατά την οποία ο φθορισμός υπερβαίνει το κατώφλι ανίχνευσης (threshold) ορίζεται ως τιμή Ct (Cycle threshold) και αντανακλά την αρχική ποσότητα του στόχου στο δείγμα. Χαμηλότερες τιμές Ct αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση του miR-26.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα τιμών Ct για την ανίχνευση του miR-26 σε εξωσωματικά δείγματα γάλακτος από διαφορετικά στάδια γαλουχίας (πρωτόγαλα, θηλασμός, απογαλακτισμός). Χαμηλότερες τιμές Ct υποδεικνύουν υψηλότερη σχετική ποσότητα του microRNA. Το δείγμα 12L παρουσίασε τη μεγαλύτερη έκφραση.

Στα δείγματα γάλακτος που αναλύθηκαν (πρωτόγαλα, θηλασμού και απογαλακτισμού), παρατηρήθηκαν διαφορετικές τιμές Ct, γεγονός που υποδεικνύει μεταβολή στα επίπεδα του miR-26 ανάλογα με το στάδιο. Ειδικότερα, δείγματα όπως το 12L παρουσίασαν χαμηλότερη τιμή Ct (~31), σε αντίθεση με δείγματα όπως το 28C ή 12W που εμφάνισαν υψηλότερες τιμές (>33), υποδηλώνοντας μικρότερη σχετική παρουσία του microRNA.

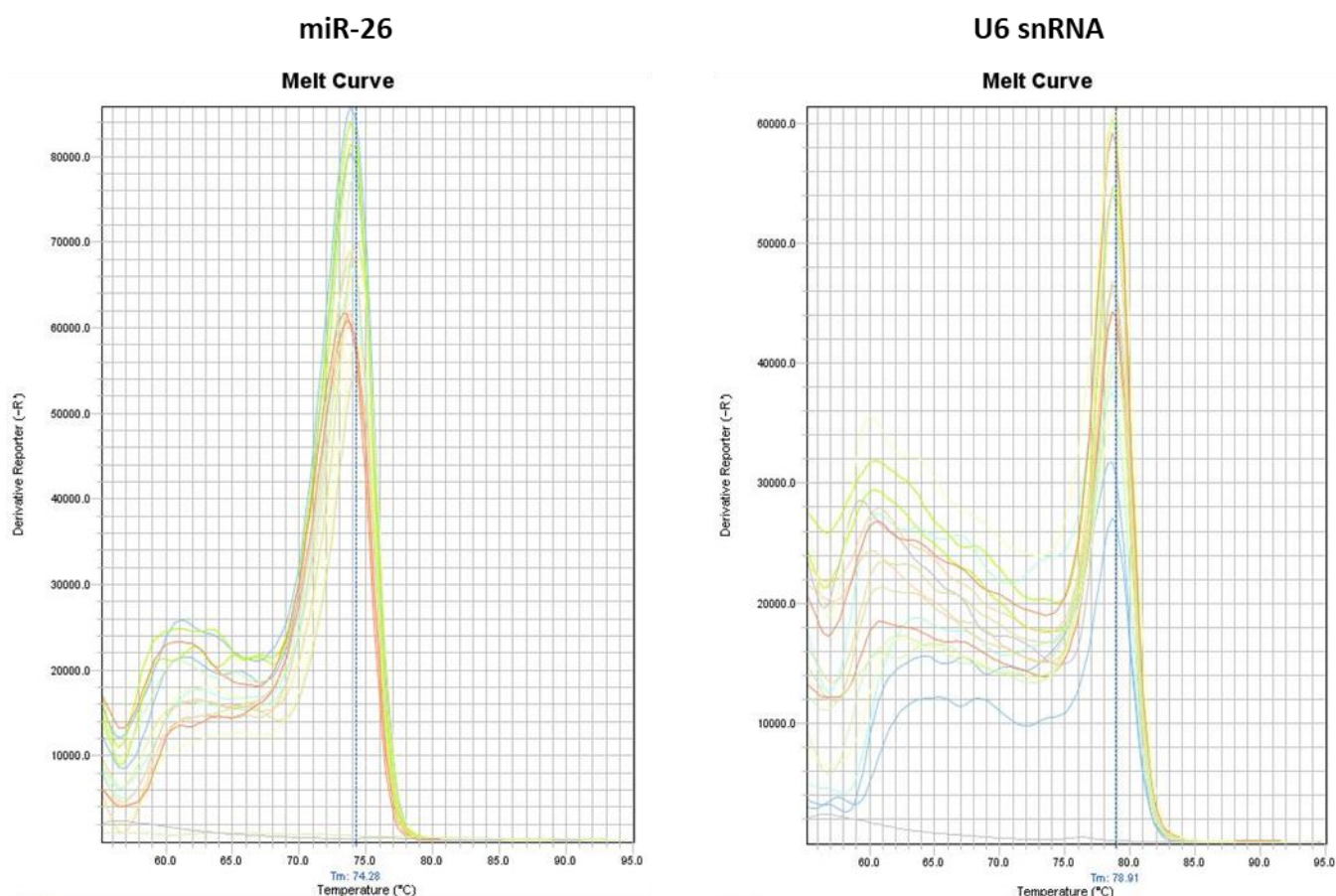
Η τιμή του κατωφλίου φθορισμού ορίστηκε αυτόματα από το λογισμικό του κυκλοποιητή και χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό του Ct σε κάθε καμπύλη ενίσχυσης.



Εικόνα 10: Καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Στο σχήμα παρατηρείται ότι το δείγμα 12L ξεπερνά νωρίτερα το κατώφλι από τα άλλα δείγματα, τα οποία δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στην εικόνα απεικονίζονται μόνο τα δείγματα που στοχεύουν το miR-26. Στον άξονα x απεικονίζεται ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον άξονα y η ποσότητα φθορισμού και η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο κατώφλι.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης qPCR, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της καμπύλης τήξης για την αξιολόγηση της ειδικότητας της ενίσχυσης. Η καμπύλη τήξης βασίζεται στη βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας και στην παρακολούθηση της μείωσης του φθορισμού καθώς το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται. Στην παρούσα ανάλυση για το miR-26 καταγράφηκε μία και μόνο κύρια κορυφή σε θερμοκρασία περίπου 74,28 °C, γεγονός που υποδηλώνει ειδική ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου. Η απουσία έντονου σήματος στην περιοχή των 70–74 °C δείχνει ότι δεν σχηματίζονται διμερή εκκινητών (primer dimers), ενώ

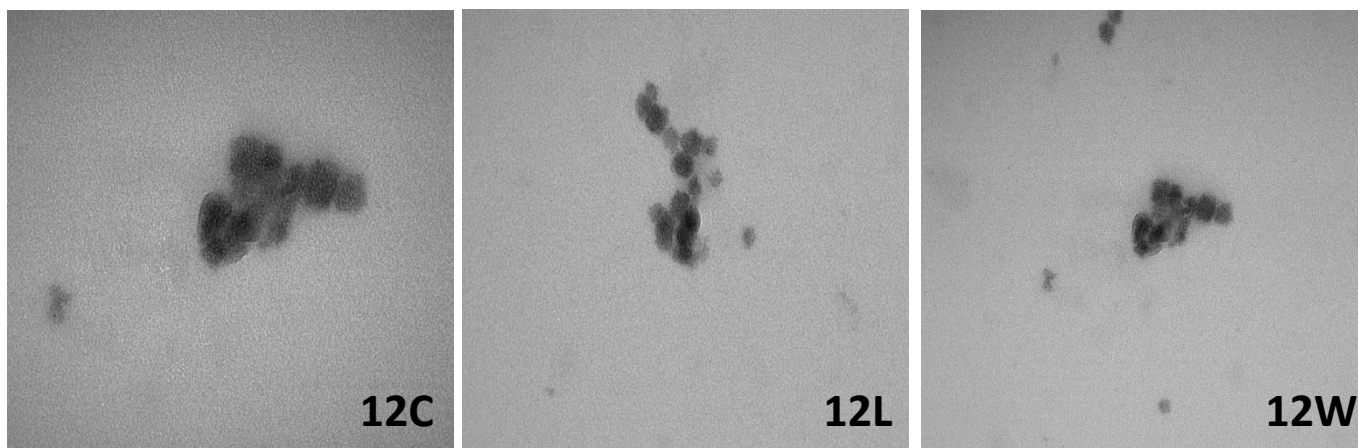
η έλλειψη δευτερευουσών κορυφών υποδεικνύει την απουσία μη ειδικών προϊόντων ενίσχυσης. Αντίστοιχη καμπύλη εμφανίστηκε και στα δείγματα που αφορούσαν το U6. snRNA με την κορυφή να εντοπίζεται στους 78,91°C.



Εικόνα 11: Καμπύλες αποδιάταξης προϊόντων μέσω θέρμανσης (Melt Curve). Στον άξονα χ'χ απεικονίζεται η θερμοκρασία, ενώ στον άξονα ψ'ψ η απορρόφηση. Στο διάγραμμα περιέχονται τα δείγματα που στοχεύουν το miR-26 (αριστερά) και το U6 snRNA (δεξιά).

4.3. Μορφολογική επιβεβαίωση εξωσωμάτων μέσω TEM (Transmission Electron Microscopy)

Η μορφολογική αξιολόγηση της απομόνωσης των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (TEM), στο εργαστήριο βιολογίας του ΕΚΠΑ του κ. Δόκτορα Ιωάννη Τουργκάκου . Από τα δείγματα γάλακτος όλων των σταδίων (πρωτόγαλα, θηλασμού και απογαλακτισμού), απεικονίστηκαν σφαιρικά σωματίδια μεγέθους περίπου 50–150 nm, τυπικά για εξωκυττάρια κυστίδια. Παρά τους περιορισμούς στην ευκρίνεια ορισμένων εικόνων, η γενική μορφολογία και το μέγεθος των παρατηρούμενων δομών συνάδουν με χαρακτηριστικά εξωσωμάτων, επιβεβαιώνοντας σε μορφολογικό επίπεδο την επιτυχή απομόνωση τους.



Εικόνα 12: Απεικόνιση εξωσωμάτων μέσω TEM σε δείγματα γάλακτος (12C, 12L, 12W). Εντοπίζονται σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 50–150 nm, συμβατά με τη μορφολογία των εξωσωμάτων.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εξωσώματα είναι μικροσκοπικά εξωκυττάρια κυστίδια με μέγεθος έως και 150 nm. Διαθέτουν ποικίλους τρόπους έκκρισης και δρουν κυρίως ως φορείς διακυτταρικής επικοινωνίας. Περιέχουν πλούσιο βιολογικό φορτίο όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα με σημαίνοντα ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Η απομόνωση των εξωσωμάτων επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων τεχνικών γεγονός που είναι κρίσιμο για την κατανόηση της βιολογικής τους λειτουργίας και την αξιοποίηση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Τα εξωσώματα μελετώνται σε αρκετά είδη ζώων όπως τα πρόβατα λόγω του ρόλου τους στην ανοσοαπόκριση, στη γαλουχία αλλά και την δυναμική τους ως διαγνωστικοί βιοδείκτες. Τα εξωσώματα από γάλατα προβάτων φέρουν χαρακτηριστικούς μοριακούς δείκτες όπως η CD9 και η TSG101. Η μελέτη των εξωσωμάτων από γάλατα προβάτων ενδέχεται να συμβάλλει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος με δυνητικές διατροφικές και θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός εξωσωμάτων με τη χρήση συμπληρωματικών μεθοδολογιών, από δείγματα γάλακτος προβάτων, τα οποία ελήφθησαν σε διαφορετικά στάδια γαλουχίας. Η παρουσία των εξωσωμάτων τεκμηριώθηκε μέσω Ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικοί δείκτες TSG101 και CD 9, καθώς και με qPCR με ανίχνευση του εξωσωματικού microRNA miR-26. Παράλληλα, η μορφολογική επιβεβαίωση επιτεύχθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία ετάδοσης (TEM) με την απεικόνιση σφαιρικών δομών μήκους 50-150 nm, τυπικών για εξωκυττάρια κυστίδια.

Αξιοσημείωτο εύρημα της παραπάνω μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι σε όλα τα δείγματα και των τριών σταδίων γαλουχίας ανιχνεύθηκαν βασικά εξωσωματικά χαρακτηριστικά, όπως οι πρωτεϊνικοί δείκτες (TSG101 αλλά και CD9 σε ορισμένα δείγματα), το miR-26 καθώς και η μορφολογία τους μέσω TEM. Παρά το γεγονός ότι σε αρκετά δείγματα υπήρξε θετική ανίχνευση-ταυτοποίηση και στις τρεις τεχνικές το δείγμα 12 L, που αντιστοιχεί σε στάδιο θηλασμού, παρουσίασε την πληρέστερη τεκμηρίωση σχετικά την απομόνωση λειτουργικών εξωσωμάτων από γάλατα προβάτων, καθώς στο δείγμα αυτό επιτεύχθηκε ανίχνευση και των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνικών δεικτών, εντοπισμός του miR-26 στον πιο χαμηλό κύκλο ανίχνευσης ($C_t = 30.8$) αλλά και κλασική εξωσωματική μορφολογία στην TEM. Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν μεταβολές στο περιεχόμενο και στα χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων ανάλογα με το στάδιο παραγωγής του γάλακτος, γεγονός που υποστηρίζει την ιδέα ότι τα εξωσώματα παίζουν ενεργό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και τη μεταφορά βιολογικών μορίων στο νεογνό. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης υποδεικνύει τη σημασία της χρονικής στιγμής συλλογής του γάλακτος από πρόβατα για την απόδοση της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού του μοριακού φορτίου (μοριακών δεικτών) των εξωσωμάτων.

Επιπλέον, η επιτυχής απομόνωση των εξωσωμάτων από γάλα προβάτων αναδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησης των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες για τα ίδια τα ζώα, ενώ παράλληλα παρουσιάζονται και οι πιθανές εφαρμογές τους στον άνθρωπο. Το εξωσωματικό μοριακό φορτίο ενδέχεται να εμφανίζει σημαντικές δυνατότητες σε ζωικό και ανθρώπινο επίπεδο. Για το λόγο αυτό, μελλοντικά, η χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης του RNA (RNA-sequencing, RNA-seq) θα συμβάλλει στην καταγραφή του RNA μοριακού φορτίου των εξωσωμάτων, αποκαλύπτοντας επιπρόσθετα ρυθμιστικά μόρια, ενισχύοντας την κατανόηση των βιολογικών-βιοχημικών ιδιοτήτων τους, τόσο στη ζωική παραγωγή, όσο και σε διατροφικές-φαρμακευτικές-ιατρικές εφαρμογές στον άνθρωπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Chen, Y.-F., Luh, F., Ho, Y.-S., & Yen, Y. (2024). Exosomes: A review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01055-0>
- Connolly, C., Yin, X., & Brennan, L. (2023). Impact of Lactation Stage on the Metabolite Composition of Bovine Milk. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(18), 6608. <https://doi.org/10.3390/molecules28186608>
- Das, A., Sonar, S., Kalele, K., & Subramaniyan, V. (2024). Milk exosomes: Harnessing nature's duality for cancer therapy. *Clinical and Translational Discovery*, 4(4), e349. <https://doi.org/10.1002/ctd2.349>
- Dilsiz, N. (2024). A comprehensive review on recent advances in exosome isolation and characterization: Toward clinical applications. *Translational Oncology*, 50, 102121. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.102121>
- Farooqi, A. A., Desai, N. N., Qureshi, M. Z., Librelotto, D. R. N., Gasparri, M. L., Bishayee, A., Nabavi, S. M., Curti, V., & Daglia, M. (2018). Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology Advances*, 36(1), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.010>
- Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
- Gruenberg, J. (2020). Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 21(1), 76–93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968-977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Lai, J. J., Chau, Z. L., Chen, S.-Y., Hill, J. J., Korpany, K. V., Liang, N.-W., Lin, L.-H., Lin, Y.-H., Liu, J. K., Liu, Y.-C., Lunde, R., & Shen, W.-T. (2022). Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(15), e2103222. <https://doi.org/10.1002/advs.202103222>

- Lee, K. W. A., Chan, L. K. W., Hung, L. C., Phoebe, L. K. W., Park, Y., & Yi, K.-H. (2024). Clinical Applications of Exosomes: A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/ijms25147794>
- Lee, Y. J., Shin, K. J., & Chae, Y. C. (2024). Regulation of cargo selection in exosome biogenesis and its biomedical applications in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(4), 877–889. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01209-y>
- Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Börger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F. A., Del Portillo, H. A., O'Driscoll, L., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Felderhoff-Mueser, U., Fraile, L., Gho, Y. S., Görgens, A., Gupta, R. C., Hendrix, A., ... Giebel, B. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials—An ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 30087. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.30087>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Liao, Y., Du, X., Li, J., & Lönnerdal, B. (2017). Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(11). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>
- Moghassemi, S., Dadashzadeh, A., Sousa, M. J., Vlieghe, H., Yang, J., León-Félix, C. M., & Amorim, C. A. (2024). Extracellular vesicles in nanomedicine and regenerative medicine: A review over the last decade. *Bioactive Materials*, 36, 126–156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.02.021>
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., & Gupta, R. C. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*, 371(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020>
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
- Saggar, R., Giri, P. C., Deng, C., Johnson, D., McCloy, M. K., Liang, L., Shaikh, F., Hong, J., Channick, R. N., Shapiro, S. S., Lynch III, J. P., Belperio, J. A., Weigt, S. S., Ramsey, A. L., Ross, D. J., Sayah, D. M., Shino, M. Y., Derhovanessian, A., Sherman, A. E., & Saggar, R. (2021). Significance of autoimmune disease in severe pulmonary hypertension complicating extensive pulmonary fibrosis: A prospective cohort study. *Pulmonary Circulation*, 11(2), 20458940211011330. <https://doi.org/10.1177/20458940211011329>
- Sedykh, S., Kuleshova, A., & Nevinsky, G. (2020). Milk Exosomes: Perspective Agents for Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6646. <https://doi.org/10.3390/ijms21186646>
- Shao, H., Chung, J., Balaj, L., Charest, A., Bigner, D. D., Carter, B. S., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Weissleder, R., & Lee, H. (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature Medicine*, 18(12), 1835–1840. <https://doi.org/10.1038/nm.2994>
- Singh, S., Dansby, C., Agarwal, D., Bhat, P. D., Dubey, P. K., & Krishnamurthy, P. (2024). Exosomes: Methods for Isolation and Characterization in Biological Samples. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2835, 181–213. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3995-5_17

- Sódar, B. W., Kittel, Á., Pálóczi, K., Vukman, K. V., Osteikoetxea, X., Szabó-Taylor, K., Németh, A., Sperlág, B., Baranyai, T., Giricz, Z., Wiener, Z., Turiák, L., Drahos, L., Pállinger, É., Vékey, K., Ferdinandy, P., Falus, A., & Buzás, E. I. (2016). Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Scientific Reports*, 6, 24316. <https://doi.org/10.1038/srep24316>
- Soleymani, T., Chen, T.-Y., Gonzalez-Kozlova, E., & Dogra, N. (2023). The human neurosecretome: Extracellular vesicles and particles (EVPs) of the brain for intercellular communication, therapy, and liquid-biopsy applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1156821. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1156821>
- Subedi, P., Schneider, M., Philipp, J., Azimzadeh, O., Metzger, F., Moertl, S., Atkinson, M. J., & Tapio, S. (2019). Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Analytical Biochemistry*, 584, 113390. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113390>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
- Thakur, A., & Kaur, H. (2022). Synthetic chemistry of cellulose hydrogels-A review. *Materials Today: Proceedings*, 48, 1431–1438. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.201>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., & Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2), 488–496. <https://doi.org/10.1002/jcb.22733>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Truby, L. K., Maamari, D., Saha, A., Farr, M., Abdulrahim, J., Billia, F., Peltz, M., Khush, K. K., & Wang, T. J. (2023). Towards Allograft Longevity: Leveraging Omics Technologies to Improve Heart Transplant Outcomes. *Current Heart Failure Reports*, 20(6), 493–503. <https://doi.org/10.1007/s11897-023-00631-z>
- Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., Yin, X., Xu, Y., Chen, L., Gao, W., Li, Y., & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*, 17(1), 163–177. <https://doi.org/10.7150/ijbs.53671>

Wolf, A., Tanguy, E., Wang, Q., Gasman, S., & Vitale, N. (2023). Phospholipase D and cancer metastasis: A focus on exosomes. *Advances in Biological Regulation*, 87, 100924. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2022.100924>

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Yu, T., Wang, P., Wu, Y., Zhong, J., Chen, Q., Wang, D., Chen, H., Hu, S., & Wu, Q. (2022). MiR-26a Reduces Inflammatory Responses via Inhibition of PGE2 Production by Targeting COX-2. *Inflammation*, 45(4), 1484–1495. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01631-2>

Zempleni, J., Sukreet, S., Zhou, F., Wu, D., & Mutai, E. (2019). Milk-Derived Exosomes and Metabolic Regulation. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7(Volume 7, 2019), 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115300>

Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>

Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>

Zhang, P., He, M., & Zeng, Y. (2016). Ultrasensitive microfluidic analysis of circulating exosomes using a nanostructured graphene oxide/polydopamine coating. *Lab on a Chip*, 16(16), 3033–3042. <https://doi.org/10.1039/C6LC00279J>

Zhang, Z., Yu, Y., Zhu, G., Zeng, L., Xu, S., Cheng, H., Ouyang, Z., Chen, J., Pathak, J. L., Wu, L., & Yu, L. (2022). The Emerging Role of Plant-Derived Exosomes-Like Nanoparticles in Immune Regulation and Periodontitis Treatment. *Frontiers in Immunology*, 13, 896745. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896745>