



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των εξωσωμάτων στην εκφυλιστική αρθρίτιδα

Πολυχρόνης Φατούρος, PhD

Βιολόγος

Τριμελής Επιτροπή

Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Επιβλέπουσα

Βαρβάρα Τραχανά Επικ. Καθηγήτρια Κυττ. Βιολογίας, Μέλος

Ιωάννα Παπαθανασίου, Επικ. Καθηγήτρια Ιατρ. Βιολογίας, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



Cytogenetics and molecular genetics laboratory

**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS - GENETIC COUNSELING”**

MASTER THESIS

The role of exosomes in osteoarthritis

Polychronis Fatouros, PhD

Biologist

Tripartite Committee

Aspasia Tsezou, Professor of Medical Genetics, supervisor

Barbara Trachana, Assistant Professor of Cell Biology, member

Ioanna Papathanasiou, Assistant Professor of Medical Biology, member

LARISA, 2021

Περιεχόμενα

<i>The role of exosomes in osteoarthritis</i>	- 1 -
<i>Περιεχόμενα</i>	- 2 -
1. Περίληψη	- 3 -
1.2 Λέξεις - Κλειδιά	- 3 -
1.3 Συντμήσεις - Αρχικά	- 4 -
1.4 Abstract	- 4 -
1.5 Keywords	- 4 -
2. Εισαγωγή	- 5 -
2.1 Η δομή και η κυτταρική σύνθεση της άρθρωσης του γονάτου	- 5 -
2.2 Οστεοαρθρίτιδα: μια σύντομη εισαγωγή.	- 7 -
2.3 Φλεγμονή και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.	- 8 -
2.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα: Οι «πυροσβέστες» της φλεγμονής στην ΟΑ	- 9 -
2.5 Εξωσώματα: Ορισμός, βιογένεση και ρόλος στην διακυτταρική επικοινωνία.	- 11 -
2.6 Τεχνικές απομόνωσης των εξωσωμάτων	- 14 -
2.6.1 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση	- 14 -
2.6.2 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων βασιζόμενη στο μέγεθός τους	- 15 -
2.6.3 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων που βασίζεται στην ανοσοσυνάφεια	- 15 -
3. Σκοπός της Διπλωματικής	- 16 -
3.1 Μέθοδος αναζήτησης βιβλιογραφικών πηγών	- 16 -
4. Κύριο Μέρος: Ανάλυση του Ρόλου των Εξωσωμάτων στην ΟΑ	- 17 -
4.1 Εξωσώματα στην παθολογία της ΟΑ, μια σύνοψη.	- 17 -
4.2 Εξωσώματα από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μυελού των οστών προωθούν την επιδιόρθωση του χόνδρου και απαλύνουν τον πόνο σε μοντέλο ΟΑ αρουραίου.	- 18 -
4.3 Εξωσώματα από ΟΑ χονδροκύτταρα προκαλούν αυξημένη έκκριση IL-1β από μακροφάγα και επιδεινώνουν την φλεγμονή του αρθρικού υμένα.	- 23 -
4.4 Εξωσώματα από MSC προστατεύουν τον αρθρικό χόνδρο και βελτιώνουν τον ΟΑ φαινότυπο μέσω αναστολής του mTOR από το miR-100-5p.	- 27 -
4.5 Εξωσώματα από βλαστοκύτταρα είναι ευεργετικά, ενώ εξωσώματα από πάσχοντες ιστούς είναι επιβλαβή για την πορεία της ΟΑ – επιπλέον μελέτες	- 33 -
5. Συμπεράσματα	- 36 -
5.1 Ο διττός ρόλος των ΕΣ στην ΟΑ	- 36 -
5.2 Προσεγγίσεις για κλινική θεραπευτική χρήση εξωσωμάτων στην ΟΑ.	- 37 -
5.3 Προσπάθειες βελτιστοποίησης, προκλήσεις και προοπτικές.	- 38 -
6. Βιβλιογραφία	- 39 -

1. Περίληψη

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια πολυπαραγοντική χρόνια εκφυλιστική νόσος που προσβάλλει τις αρθρώσεις και έχει τεράστιο κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο παγκοσμίως στον ανθρώπινο πληθυσμό που γηράσκει ολοένα και περισσότερο. Στην οστεοαρθρίτιδα πάσχουν όλοι οι ιστοί της άρθρωσης αλλά βασικό της γνώρισμα είναι ο εκφυλισμός του χόνδρου, με αποτέλεσμα την σταδιακή απώλεια της λιπαντικής ικανότητας στην άρθρωση, εκτεταμένη φλεγμονή και πόνο που δυσκολεύει τις κινήσεις και επιφέρει σημαντική μείωση στην ποιότητα ζωής. Μέχρι τώρα η φαρμακευτική αντιμετώπιση εντοπίζεται στη μείωση των συμπτωμάτων, με την ολική αρθροπλαστική να είναι η έσχατη λύση. Μοντέρνες λύσεις βιοτεχνολογίας με κυτταρικές θεραπείες στοχεύουν στην ενδογενή ανάπλαση και επιβράδυνση της ΟΑ και φαίνεται πως η ευεργετική δράση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρακρινή τους δράση και όχι τόσο στην άμεση διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα. Όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί της άρθρωσης επικοινωνούν μεταξύ τους και η επικοινωνία αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την ομοιόσταση. Τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια που παράγονται στα κύτταρα από το ενδοσωμικό μονοπάτι και εκκρίνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον, με πλούσιο φορτίο από mRNAs, lncRNAs, miRNAs, πρωτεΐνες, λιπίδια και μεταβολίτες. Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι τα εξωσώματα αποτελούν σημαντικό εργαλείο πολυσχιδούς διακυτταρικής επικοινωνίας που ελέγχει και ρυθμίζει πολλούς σηματοδοτικούς κόμβους στα κύτταρα, επηρεάζοντας τη γονιδιακή τους έκφραση και το φαινότυπό τους. Εξωσώματα που προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα συμβάλλουν στην κατάσβεση της φλεγμονής και γέρνουν την πλάστιγγα προς αναβολικές διεργασίες, φρενάροντας τον φαύλο κύκλο του καταβολισμού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της MMP-13 που αποδομεί εξωκυττάρια ουσία και της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6 και αύξησης του κολλαγόνου τύπου II. Αντιθέτως, εξωσώματα που παράγονται από τα πάσχοντα κύτταρα όπως χονδροκύτταρα ή κύτταρα του αρθρικού υμένα, προάγουν τον καταβολισμό και οδηγούν σε αναζωπύρωση της φλεγμονής. Μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην διαγνωστική ή και θεραπευτική αξιοποίηση των εξωσωμάτων για την καταπολέμηση της μαστιγας της εκφυλιστικής αρθρίτιδας.

1.2 Λέξεις - Κλειδιά

Οστεοαρθρίτιδα, εξωσώματα, μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, χονδροκύτταρα, βιοδείκτες

1.3 Συντμήσεις - Αρχικά

OA	:	Οστεοαρθρίτιδα
ΕΣ	:	Εξωσώματα
MSC	:	Mesenchymal Stem Cells
IFFP	:	Infrapatellar fat pad
MVB	:	Multivesicular Bodies

1.4 Abstract

Osteoarthritis (OA) is a multifactorial chronic degenerative disease that affects the joints and has huge socioeconomic impact worldwide in the increasingly aging human population. In OA all joint tissues are affected but the major characteristic is the cartilage degeneration with the consequence of gradual loss of lubrication function in the joint combined with extensive inflammation and periodic pain that hinders motility and causes significant deterioration of the quality of life. Pharmaceutical intervention is limited to symptom attenuation, with total arthroplasty being the ultimate solution. Modern biotechnology approaches with stem cell therapies aim towards activating endogenous regeneration to slow down OA and it seems that the beneficial activity of mesenchymal stem cells (MSC) is mainly due to their paracrine function rather than their direct differentiation to chondrocytes. All cell types in the joint communicate with each other in a complex network and this communication is cardinal for homeostasis. Exosomes are membrane-bound lipid vesicles that are produced by cells via the endosomal pathway and are released in the extracellular environment to be taken up by other cells, carrying a rich cargo of mRNAs, miRNAs, proteins, lipids and metabolites. Recent research has shown that exosomes constitute a valuable tool of versatile intercellular communication that controls and regulates many signaling hubs in recipient cells, impinging on their genetic expression and phenotype. Exosomes derived from MSCs contribute to alleviating inflammation and turn the scale towards anabolic functions, breaking the vicious cycle of catabolism. They achieve this by reducing pro-inflammatory IL-6 cytokine and MMP-13 which degrades extracellular matrix, while increasing vital collagen type II. On the contrary, exosomes derived from diseased cells like chondrocytes or synovial cells, induce catabolism and fuel the inflammation. Great scientific interest is focused on leveraging the diagnostic and/or therapeutic value of exosomes towards combatting this debilitating disease.

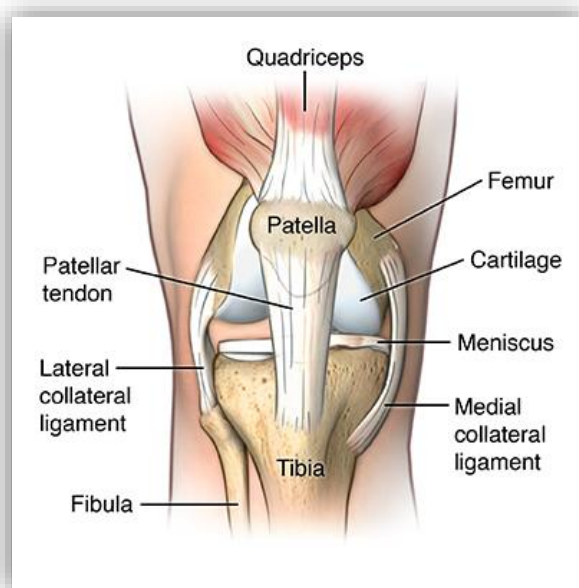
1.5 Keywords

Osteoarthritis, exosomes, mesenchymal stem cells, chondrocytes, biomarkers

2. Εισαγωγή

2.1 Η δομή και η κυτταρική σύνθεση της άρθρωσης του γονάτου

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα ή αλλιώς οστεοαρθρίτιδα (OA) είναι μία χρόνια, μη αναστρέψιμη και εκφυλιστική πάθηση. Είναι η πιο κοινή ασθένεια του μυοσκελετικού συστήματος και προσβάλλει όλες τις αρθρώσεις, με μεγαλύτερη συχνότητα αυτές των γονάτων (Jang et al., 2021). Οι αρθρώσεις παρουσιάζουν παρόμοια δομή και για αυτό το λόγο εδώ θα αναφερθεί επιγραμματικά η δομή της άρθρωσης του γονάτου ως μοντέλο άρθρωσης. Στην άρθρωση του γονάτου συναντάται το μηριαίο οστό με την κνήμη, οι χιαστοί και πλάγιοι σύνδεσμοι, ο μηνίσκος και η επιγονατίδα που σταθεροποιείται από τους συνδέσμους πρόσθια της άρθρωσης (**Εικόνα 1**).

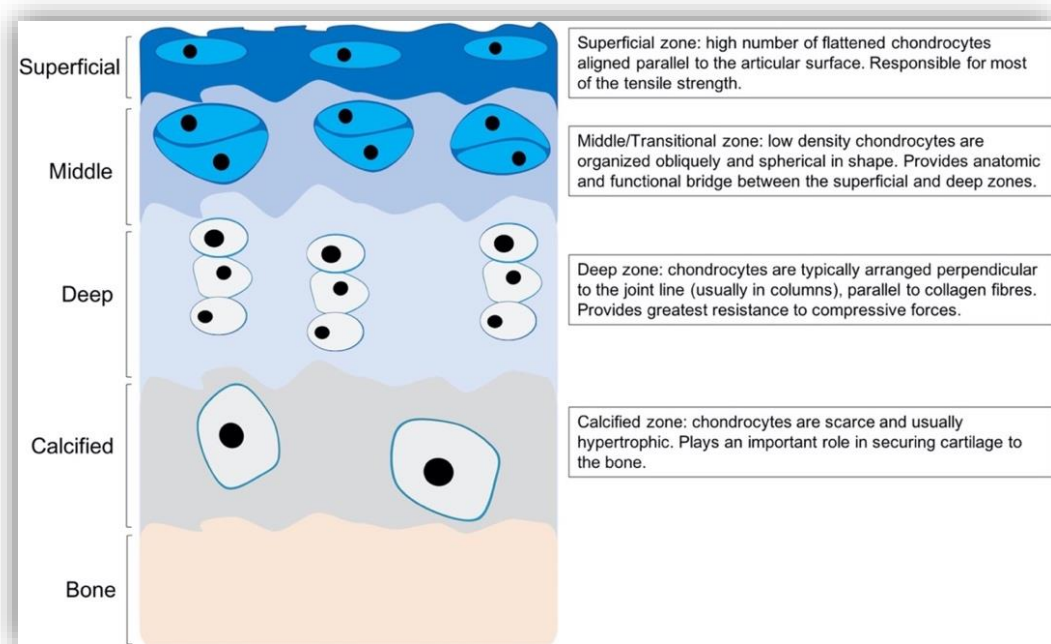


Εικόνα 1. Η ανατομία της άρθρωσης του γονάτου με τις κύριες δομές.

Comprehensive Orthopedics, S.C. (<https://comportho.com/anatomy/anatomy-of-the-knee/>)

Η άρθρωση περικλείεται από την αρθρική μεμβράνη/αρθρικό υμένα που οριοθετεί την αρθρική κοιλότητα δημιουργώντας ένα σχετικά «κλειστό σύστημα» και που κατά κύριο λόγο περιέχει ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν την άρθρωση και από τα οποία μπορούν να εισέλθουν κύτταρα του ανοσοποιητικού (λεμφοκύτταρα και μακροφάγα). Χόνδρος επικαλύπτει τις επιφάνειες των οστών που συμμετέχουν στην άρθρωση. Ο χόνδρος αποτελείται από 5% χονδροκύτταρα και από 95% νερό με εξωκυττάρια ουσία και σχηματίζει 4 διακριτές στιβάδες (**Εικόνα 2**)(Ng et al., 2020). Είναι ένα σύστημα μοναδικό στο ανθρώπινο σώμα από την άποψη πως αποτελείται αποκλειστικά από χονδροκύτταρα και μέσα στον χόνδρο

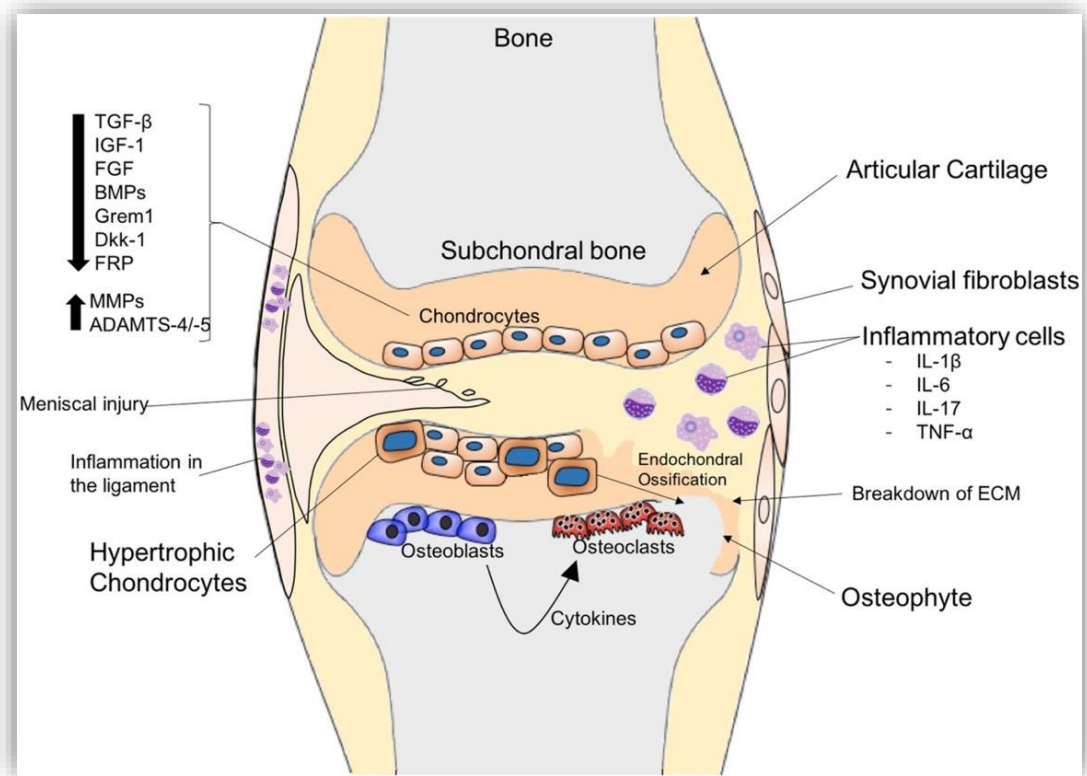
δε συναντάται κανένα άλλο είδος κυττάρου, δε περιέχει νεύρα ή αιμοφόρα αγγεία. Υπάρχουν βέβαια διάφοροι υπότυποι χονδροκυττάρων, με τελευταία δεδομένα από single-cell sequencing μελέτες να ξεχωρίζουν έως και 7 υποτύπους χονδροκυττάρων (Ji et al., 2019). Η εξωκυττάρια ουσία που είναι κρίσιμης σημασίας για τη δομή και λειτουργία του χόνδρου, αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου 2, υαλουρονικό οξύ και διάφορες πρωτεογλυκάνες (κυρίως Αγκρεκάνη) (Chow and Chin, 2020). Τα πρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα παρέχουν τις εμβιομηχανικές εκείνες ιδιότητες στο χόνδρο που του επιτρέπουν να αντέχει σε δυνάμεις εφελκυσμού και συμπίεσης.



Εικόνα 2 Η κυτταρική δομή του χόνδρου με τις 4 διακριτές στιβάδες ((Ng et al., 2020)

Παρουσιάζονται οι ζώνες του αρθρικού χόνδρου 1) επιφανειακή 2) μεσαία, 3) εν τω βάθει και 4) ζώνη ασβεστοποίησης.

Το αρθρικό υγρό παρεμβάλλεται μεταξύ των επιφανειών του χόνδρου και γεμίζει την αρθρική κοιλότητα προσφέροντας την απαραίτητη λίπανση για την μηχανική λειτουργία της άρθρωσης αλλά και την «σκηνή» στην οποία εκλύονται σηματοδοτικοί παράγοντες ενώ εκτυλίσσονται αλληλεπιδράσεις και επικοινωνία χονδροκυττάρων με κύτταρα του ανοσοποιητικού (Chen et al., 2017; Ng et al., 2020), κάτι που όπως θα εξηγηθεί και στη συνέχεια (ενότητα 2.3), έχει εξέχοντα ρόλο στην εκδήλωση του παθολογικού φαινοτύπου της ΟΑ (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3 Διάγραμμα της οστεοαρθρικής παθολογίας στην άρθρωση.

Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων και κύριοι παράγοντες φλεγμονής παρουσιάζονται σχηματικά. (Wu et al., 2020)

2.2 Οστεοαρθρίτιδα: μια σύντομη εισαγωγή.

Ο επιπολασμός της ΟΑ είναι πολύ υψηλός, με πάνω από 300 εκατομμύρια ασθενών ανά τον κόσμο και πιο συχνός στις γυναίκες, ενώ αποτελεί βασική αιτία ανικανότητας των ηλικιωμένων (Di Nicola, 2020). Εξαιτίας της ολοένα αυξανόμενης γήρανσης του πληθυσμού, η ασθένεια αυτή που σχετίζεται ισχυρά με την ηλικία, θα αυξάνει σε συχνότητα και ήδη έχει τεράστιο κοινωνικο-οικονομικό κόστος παγκοσμίως (Hunter et al., 2014). Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Π.Ο.Υ. πάνω από 1 στους 4 άνω των 65 ετών πάσχει. Η ΟΑ προσβάλλει διάφορες αρθρώσεις, με κυριότερες αυτές των γονάτων, των ποδιών, δακτύλων, ισχίου, αυχένα και σπονδυλικής στήλης. Η ΟΑ χαρακτηρίζεται κυρίως από φλεγμονή της άρθρωσης, σταδιακή απώλεια του αρθρικού χόνδρου, εκφυλισμό των μηνίσκων και των συνδέσμων, πάχυνση του υποχόνδριου οστού και τον σχηματισμό οστεοφύτων (Wu et al., 2020) (**Εικόνα 3**). Πολλαπλοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην εξέλιξη της ΟΑ, συμπεριλαμβανομένου της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (ενδογενές με μακροφάγα αλλά και επίκτητο με Τ κύτταρα) και της ανισορροπίας μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών που τελικώς οδηγούν σε

αποδόμηση του χόνδρου (και του υποχόνδριου οστού) (Chen et al., 2017; Ng et al., 2020). Η ΟΑ είναι μια πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή ασθένεια, με κύρια εμπλεκόμενα κυτταρικά μονοπάτια αυτά της φλεγμονής, του μεταβολισμού των λιπιδίων και της ομοιόστασης του χόνδρου (Aubourg et al., 2021; Tsezou, 2014). Μέχρι σήμερα, η φαρμακευτική αγωγή για ΟΑ μπορεί μόνο να απαλύνει τα συμπτώματα και όχι να ιάσει την ασθένεια, για την οποία συχνά η έσχατη λύση είναι η ολική αρθροπλαστική (Wu et al., 2020). Ο χαρακτηριστικός κλινικός φαινότυπος που παρουσιάζεται στην οστεοαρθρίτιδα εξαιτίας της απώλειας του αρθρικού χόνδρου και της εκτεταμένης φλεγμονής στην άρθρωση είναι αρθρικός πόνος, οίδημα, αστάθεια, δυσκαμψία, περιορισμός της κινητικότητας, με συνέπεια σημαντική μείωση στην ποιότητα ζωής του ασθενούς, σε μια πορεία με υφέσεις και εξάρσεις (Schulze-Tanzil, 2021).

2.3 Φλεγμονή και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.

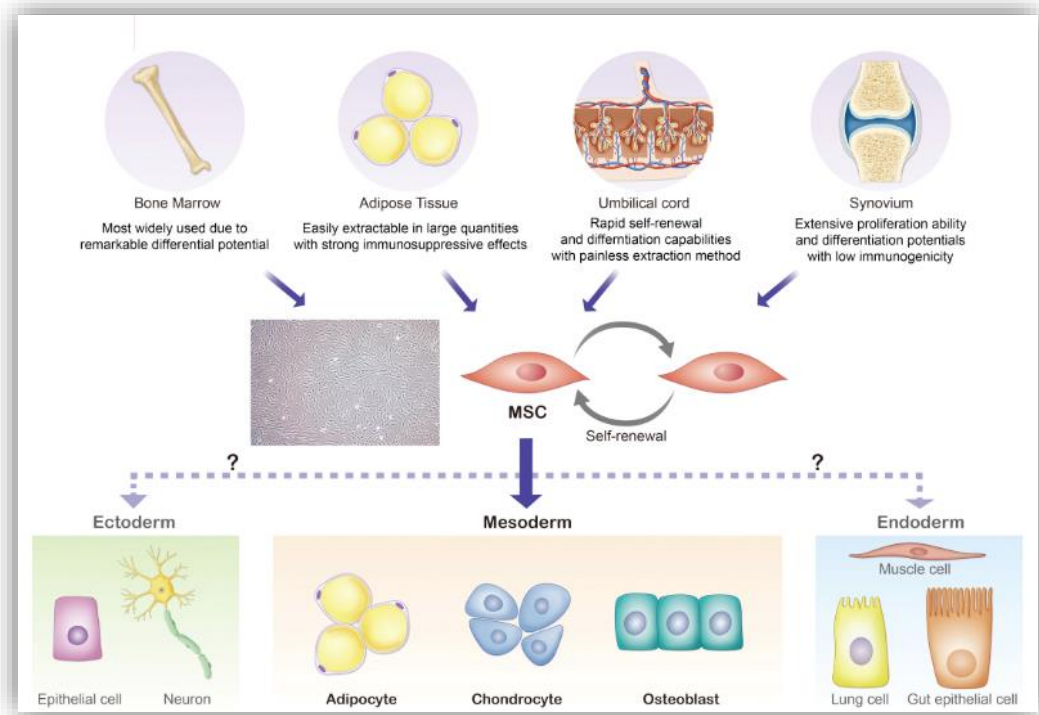
Η προσπάθεια διαλεύκανσης των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που οδηγούν στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο και αυτό είναι ζωτικό για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Τα χονδροκύτταρα είναι ευαίσθητα σε φυσικό τραυματισμό και ακραίες μηχανικές δυνάμεις αλλάζουν την ισορροπία αναβολικών και καταβολικών παραγόντων, επάγοντας φλεγμονή κατόπιν τραυματισμού (Jang et al., 2021). Καταβολικά ένζυμα όπως η Μεταλλοπρωτεϊνάση της εξωκυττάριας ουσίας 13 (Matrix Metalloproteinase 13, MMP-13), ο κύριος παράγοντας αποδόμησης του κολλαγόνου τύπου II, και μεταλλοπρωτεϊνάσες με μοτίβα θρομβοσπονδίνης (ADAMTS-4 και 5) που αποικοδομούν την κύρια πρωτεογλυκάνη Αγκρεκάνη (AGC), υπερεκφράζονται στα χονδροκύτταρα και τα κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης στην ΟΑ (**Εικόνα 3** και (Ng et al., 2020)). Προϊόντα αποικοδόμησης του χόνδρου απελευθερώνονται μέσα στην άρθρωση και έρχονται σε επαφή με κύτταρα του υμένα, ενεργοποιώντας την έκφραση και σύνθεση υποκινητών της φλεγμονής όπως ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ιντερλευκίνη 6 (IL-6), IL-17 και παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNFα), που επιδεινώνουν την κατάσταση. Μακροφάγα και άλλα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας όπως βασεόφιλα μαστοκύτταρα παρεισφρέουν στην άρθρωση και συμμετέχουν επίσης στον καταιγισμό προ-φλεγμονωδών κυταροκινών. Τα μακροφάγα παίζουν ενεργό ρόλο στην ΟΑ (Zhang et al., 2020), ευθύνονται για την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου αλλά επάγουν και τη δημιουργία οστεοφύτων μέσω της αλληλεπίδρασής του με οστεοβλάστες και οστεοκλάστες στο υποχόνδριο οστό που εκτίθεται πλέον στο αρθρικό υγρό της κοιλότητας (**Εικόνα 3**). Πλέον κερδίζει έδαφος η θεωρία που θέλει την αρθρική φλεγμονή να είναι η απάντηση των αρθρικών μακροφάγων σε θραύσματα χόνδρου και καταβολικούς παράγοντες που μπαίνουν στην αρθρική κοιλότητα (Zhang et al., 2020). Μακροφάγα που απομονώνονται

από αρθρώσεις OA ασθενών έχουν κυρίως τον M1 προ-φλεγμονώδη φαινότυπο/πόλωση, ενώ η στροφή προς τον M2 φαινότυπο σημαίνει και αντιστροφή σε πιο αντι-φλεγμονώδη λειτουργία (van den Bosch, 2021; Zhang et al., 2020).

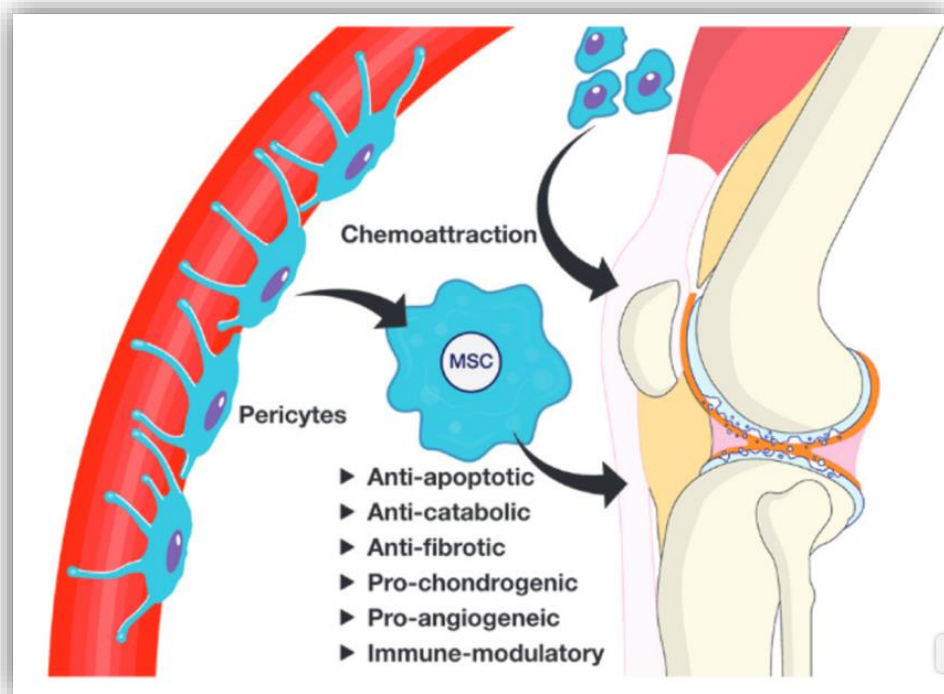
2.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα: Οι «πυροσβέστες» της φλεγμονής στην OA

Στην προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκε ότι τα χονδροκύτταρα με τα μακροφάγα μπλέκονται σε ένα φαύλο κύκλο φλεγμονής και καταβολισμού του χόνδρου, όπου η αρχική βλάβη ενεργοποιεί κυτοκίνες και σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν περαιτέρω τα μακροφάγα τα οποία με τη σειρά τους πυροδοτούν ακόμα περισσότερο τη φλεγμένουςα κατάσταση με κλιμάκωση της ασθένειας. Υπάρχουν όμως και αντισταθμιστικοί παράγοντες όπως φαίνεται, με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC) να έχουν συγκεντρώσει τη προσοχή των ερευνητών και τις ελπίδες της αναγεννητικής ιατρικής και της βιοτεχνολογίας για την καταπολέμηση της OA.

Τα MSC είναι πολυδύναμα πρόδρομα κύτταρα που αρχικά είχαν περιγραφεί ως πρόδρομοι ινοβλάστες στον μυελό των οστών αλλά μετέπειτα δείχθηκαν να έχουν εντυπωσιακό δυναμικό να δώσουν ιστούς του μεσοδέρματος, όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, μυοβλάστες, ακόμα και νευρικά κύτταρα (De Bari and Roelofs, 2018; Jiang et al., 2021; Kalamegam et al., 2018; Kim and Keating, 2019; Zhang et al., 2021). Τα MSC συμμετέχουν στην ομοιοστάση και αναγέννηση των συνδετικών ιστών και είναι γνωστό πως μεταναστεύουν σε ιστούς ως επακόλουθο τραυματισμού ή φλεγμονής όπου και λαμβάνουν μέρος στην επιδιόρθωση της βλάβης. Παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτική δράση εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των CD4+ & CD8+ T αλλά και των B κυττάρων και των NK κυττάρων («φυσικοί φονείς»), παράλληλα με τροφική δράση προς τα χονδροκύτταρα (De Bari and Roelofs, 2018; Kong et al., 2017; Mancuso et al., 2019; Zhao et al., 2020b). Τα MSC αποτελούν την κύρια πηγή βλαστοκυττάρων από ενηλίκους και απαντώνται σε ποικιλία ιστών όπως μυελός των οστών, λιπώδης ιστός, σκελετικοί μύες αλλά και στην άρθρωση (Markov et al., 2021) και **Εικόνα 4**. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν πολυσχιδή λειτουργία και αλληλεπίδραση με άλλους κυτταρικούς τύπους κυρίως με την παρακρινή τους δράση (**Εικόνα 5**), εκκρίνοντας σειρά παραγόντων όπως κυτοκίνες (PGE2, GM-CSF, IL-7, IL-10, IL-8), χημειοκίνες (SDF-1) ή αυξητικούς παράγοντες που έχουν πολλαπλές επιδράσεις (Markov et al., 2021; Yadav et al., 2020).



Εικόνα 4 Η προέλευση και η διαφοροποιητική ικανότητα των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. (Hwang et al., 2021).



Εικόνα 5 Η πολυσχιδής δράση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στην άρθρωση. (Mancuso et al., 2019).

Θεωρείται ότι μεγάλο μέρος της παρακρινούς αυτής λειτουργίας, επιτελείται μέσω της παραγωγής και απελευθέρωσης εξωσωμάτων, κυστιδίων με πλούσιο περιεχόμενο που παράγονται από τα MSC και παραλαμβάνονται από κύτταρα δέκτες (De Luna et al., 2020; Ni et al., 2020; Zhou et al., 2020a) (τα εξωσώματα θα παρουσιαστούν στην αμέσως επόμενη ενότητα). Τα MSC έχει δειχθεί ότι αποτρέπουν ή μειώνουν την απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις σε ποικιλία *in vitro* και *in vivo* μοντέλων νόσων, ενώ προωθούν τόσο την αγγειογένεση που βοηθά στην ανάπλαση ιστών όσο και την προσέλκυση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (**Εικόνα 5**). Πράγματι, διαφαίνεται από πολλές πρόσφατες έρευνες ότι ο συνδυασμός των διαφορετικών λειτουργιών των εκκρινόμενων παραγόντων είναι μεγάλου ενδιαφέροντος για την αναγεννητική ιατρική και εν προκειμένω την ανάπλαση της άρθρωσης στην ΟΑ, τόσο μέσω της ανοσοκατασταλτικής δράσης, αλλά και της προώθησης του πολλαπλασιασμού των ενδογενών πρόδρομων κυττάρων όπως και της εμπόδισης της απόπτωσης ή και της αποδιαφοροποίησης των τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων που παρατηρείται σε εκφυλιστικές ασθένειες όπως η ΟΑ (Im, 2021; Jiang et al., 2021; De Luna et al., 2020; Zhang et al., 2021). Τα MSC ευρίσκονται σε πολλούς ιστούς της άρθρωσης όπως αρθρικός υμένα, μηνίσκος, σύνδεσμοι, λιπώδες μαξιλάρι της επιγονατίδας (infrapatellar fat pad) και αρθρικό υγρό (De Bari et al., 2001; Hong et al., 2019). Από αυτό απορρέει και η άποψη πως ο ρόλος των MSC στην άρθρωση είναι ζωτικής σημασίας και πιθανότατα συμμετέχουν στην ομοιόσταση του συστήματος, είτε αναστέλλοντας τη φλεγμονή μέσω ανοσοτροποποίησης (immune modulation), είτε παρέχοντας μία πηγή νέων πρόδρομων κυττάρων όπως χονδροβλάστες, είτε παράγοντας ακόμα και πρωτεογλυκάνες για ανανέωση της επιφανειακής στοιβάδας του χόνδρου (Alcaraz et al., 2019; Fuloria et al., 2021; Harrell et al., 2019; Somoza et al., 2014).

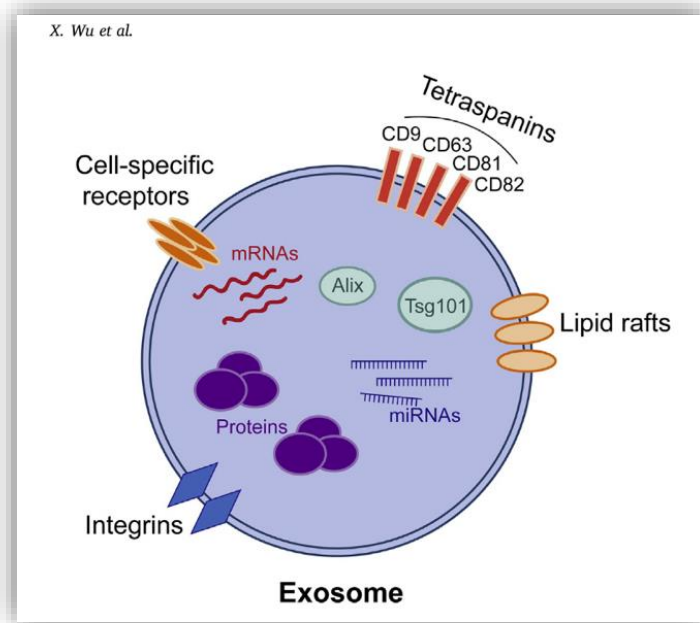
Τα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα έχουν εδώ και χρόνια χρησιμοποιηθεί ως αυτόλογη κυτταρική θεραπεία για την ΟΑ με απευθείας έγχυση στο κλειστό σύστημα της άρθρωσης. Πολλές κλινικές έρευνες έχουν αναφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ενώ άλλες δεν εντοπίζουν σημαντική κλινική ωφέλεια (Biazzo et al., 2020; Ding et al., 2020; Huang et al., 2020; Markov et al., 2021; Richards et al., 2016). Με το δεδομένο ότι η δράση τους θεωρείται ότι εκτελείται κυρίως με παρακρινή τρόπο, τελευταία γίνεται προσπάθεια να μελετηθούν ιδιαίτερα τα «πακέτα» που στέλνουν για αυτή την παρακρινή δράση, τα λεγόμενα «εξωσώματα» (Moghadasi et al., 2021).

2.5 Εξωσώματα: Ορισμός, βιογένεση και ρόλος στην διακυτταρική επικοινωνία.

Τα εξωσώματα (ΕΣ) είναι κυστίδια με διλιπιδική μεμβράνη που απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, με τα περιεχόμενά τους να

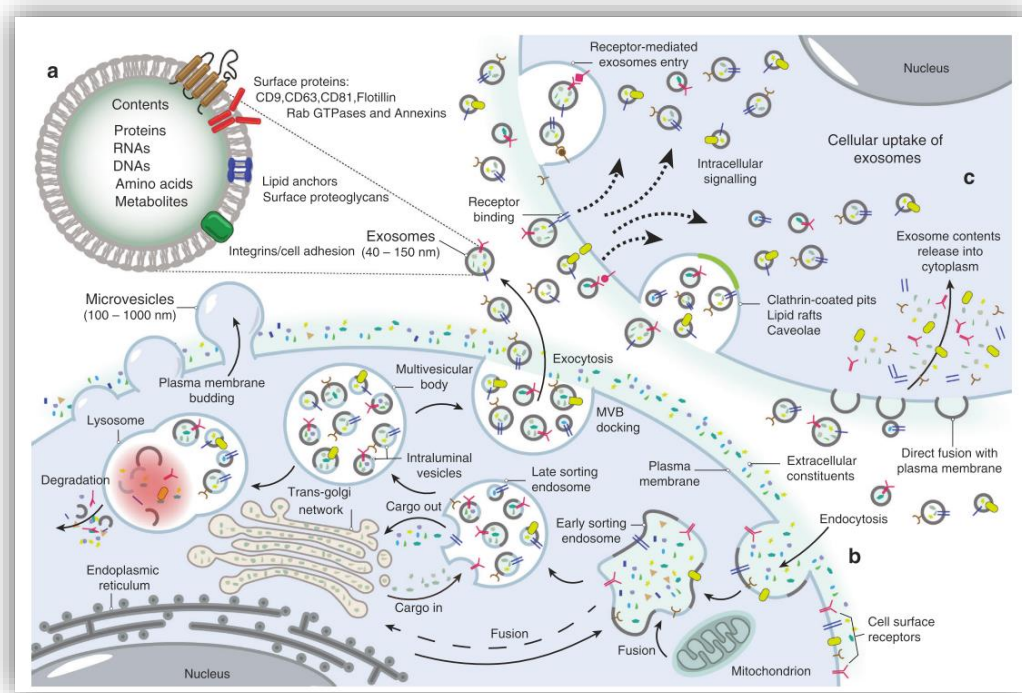
εξαρτώνται αφενός από την πηγή προέλευσής τους, αφετέρου να αποτελούν σημαντικό μέσο επικοινωνίας των κυττάρων (Ni et al., 2020). Η διάμετρος των εξωσωμάτων κυμαίνεται από 30 έως 150 nm και αρχικά σχηματίζονται από πολυκυστιδικά σωμάτια στο ενδοσωμικό μονοπάτι (Wu et al., 2020). Περιέχουν ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων (**Εικόνα 6**) και οι πληροφορίες για αυτά συνεχώς εμπλουτίζονται. Η βάση δεδομένων ExoCarta (www.exocarta.org) συγκεντρώνει επικυρωμένες λίστες των διαφόρων βιομορίων που απαντώνται μέσα σε ΕΣ. Τον Αύγουστο του 2021 η ExoCarta περιείχε στοιχεία από 286 μελέτες που αναφέρουν 9.769 πρωτεΐνες, 3.408 mRNA, 2.838 microRNA και πάνω από 1000 διαφορετικά μόρια βιοδραστικών λιπιδίων, ως περιεχόμενα των ΕΣ προέρχονται από διάφορα κύτταρα.

Η βιογένεσή τους ξεκινά με εσωτερικές εγκολπώσεις μικροδομών της κυτταρικής μεμβράνης που επικαλύπτονται από κλαθρίνη (Behera and Tyagi, 2018). Μετά την εγκόλπωση αυτή δημιουργούνται τα πρώιμα ενδοσώματα που αποκτούν φορτία με τη βοήθεια του ενδοσωμικού συμπλόκου διαλογής (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT), εν συνεχεία προχωρώντας προς ώριμα ενδοσώματα (late endosomes) επιλέγοντας φορτία, συσσωρεύονται δημιουργώντας πολυκυστιδικά σωμάτια (Multivesicular Bodies – MVBs) (Ni et al., 2020). Τα MVBs στη συνέχεια ακολουθούν 2 οδούς: είτε συντήκονται με τα λυσοσώματα για αποδόμηση των περιεχομένων, είτε εν τέλει συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη απελευθερώνοντας τα κυστίδια στον εξωκυττάριο χώρο, που τώρα ορίζονται ως εξωσώματα (Behera and Tyagi, 2018) (**Εικόνα 7**). Αφού απελευθερωθούν τα ΕΣ στον εξωκυττάριο χώρο, είναι πλέον διαθέσιμα για περισυλλογή από άλλα κύτταρα-δέκτες, τα οποία τα προσλαμβάνουν με διάφορους τρόπους όπως σύντηξη με τη μεμβράνη, μέσω υποδοχέων ή και με λάκκους κλαθρίνης – ενδοκυττάρωση και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε φαινοτυπικές αλλαγές και τροποποιήσεις γονιδιακής έκφρασης στο δέκτη. Παλαιότερα πιστευόταν ότι τα εξωσώματα απλώς απομάκρυναν άχρηστες ουσίες από τα κύτταρα, σήμερα όμως καθίσταται πλέον σαφές ότι αποτελούν ένα σημαντικό μονοπάτι επικοινωνίας και διακυτταρικής ανταλλαγής πληροφοριών, ζωτικό για την ομοίωση καθώς και ότι απαντώνται σε όλα τα βιολογικά υγρά (Chang et al.; Jeyaraman et al., 2020; Mianehsaz et al., 2019; Ni et al., 2020; Suh et al., 2021).



Εικόνα 6. Διάγραμμα του Εξωσώματος (Wu et al., 2020).

Τα εξωσώματα είναι εξοκυτταρικά κυστίδια που προέρχονται από ενδοσώματα, με μέγεθος από 30nm έως 100nm. Κυτταροειδικό υποδοχείς, ιντεγκρίνες και λιπιδικές «σχεδίες» μπορούν να βρεθούν στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης τους, που συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία. Σχεδόν όλα τα εξωσώματα περιέχουν τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81, CD82), όπως και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη βιογένεση των πολυκυτταριακών σωματίων τα οποία δίνουν εξωσώματα (Alix, Tsg101), πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) και μερικές φωσφολιπάσες. Εκτός από πρωτεΐνες, τα εξωσώματα περιέχουν επίσης mRNAs καθώς και microRNAs αλλά και μεταβολίτες. Η σύνθεση των εξωσωμάτων αντικατοπτρίζει τη βιολογική κατάσταση των μητρικών τους κυττάρων αλλά επηρεάζει και τις λειτουργίες τους.



Εικόνα 7. Η βιογένεση των εξωσωμάτων (Ni et al., 2020).

a) Τα εξωσώματα περιέχουν διάφορους τύπους πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, αμινοξέων και μεταβολιτών, από τα οποία τα CD9, CD63, CD81, Φλοτιλίνη και Ανεξίννες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες. b) Εξωκυττάρια περιεχόμενα και μεμβρανικές πρωτεΐνες εισέρχονται με ενδοκύττωση και εγκολπώσεις της κυτταρικής μεμβράνης. Η σύντηξη των πρώιμων εγκολπώσεων με το ενδοπλασματικό, το Golgi ή τα μιτοχόνδρια δίνει τα πρώιμα διαχωριστικά ενδοσώματα (early sorting endosomes, ESEs). Στη συνέχεια, τα ESEs με δευτερογενείς εγκολπώσεις, συνενώσεις και μετατροπές του φορτίου δίνουν τα ώριμα ενδοσώματα τα οποία ομαδοποιούνται σε πολυκυστιδικά σωματίδια (MVBs). Κατόπιν, κάποια από τα εξωσώματα συντήκονται με λυσοσώματα και τα περιεχόμενα τους αποδομούνται. Άλλα MVBs μεταφέρονται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης όπου αγκυροβολούν, μέχρι να γίνει σύντηξη και εξωκυττάρωση των περιεχομένων ως κυστίδια που τώρα ονομάζονται εξωσώματα. c) Τα εξωσώματα συλλέγονται από κύτταρα δέκτες με διάφορους τρόπους, όπως σύντηξη με τη μεμβράνη, μέσω υποδοχέων, με λάκκους κλαθρίνης, με λιπιδικές σχεδίες και κ.ο.κ.

2.6 Τεχνικές απομόνωσης των εξωσωμάτων

Έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι απομόνωσης των εξωσωμάτων από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειών ή βιολογικά υγρά, που βασίζονται είτε στο συγκεκριμένο εύρος μεγέθους που παρουσιάζουν, είτε στη διαφορά καθίζησης, είτε και σε χαρακτηριστικούς επίτοπους επιφανείας που επιτρέπουν συλλογή με ανοσοσυνάφεια (Kim et al., 2021). Οι κυριότερες τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

2.6.1 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση

Η απομόνωση καθαρών εξωσωμάτων είναι ύψιστης σημασίας τεχνική για την επιτυχή μελέτη του ρόλου τους σε ιστούς και σε ασθένεια. Η πιο δημοφιλής είναι η μέθοδος της υπερφυγοκέντρωσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σχεδόν το 80% των άρθρων για ΕΣ χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο (Kim et al., 2021). Είναι όμως μια σχετικά δύσκολη και απαιτητική σε χρόνο τεχνική, που χρειάζεται μεγάλες αρχικές ποσότητες και έχει μικρή απόδοση υλικού. Εν τω μεταξύ εξελίχθηκε σε υπερφυγοκέντρωση με βαθμίδωση πυκνότητας που μπορεί να ξεχωρίσει τα ΕΣ καλύτερα από τα μεγάλα πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Ο μηχανισμός διαχωρισμού βασίζεται στο σωματιδιακό μέγεθος και τη διαφορά πυκνότητας μεταξύ των υλικών όπως κύτταρα, κυστίδια και πρωτεΐνες. Μετά από την υπερφυγοκέντρωση σε βαθμιδωτή πυκνότητα τα ΕΣ συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες στιβάδες από τις οποίες μπορούν με προσοχή να διαχωριστούν και να καθαριστούν από προσμίξεις. Η μέθοδος της υπερφυγοκέντρωσης σε βαθμιδωτή πυκνότητα θεωρείται το «χρυσό σάνταρ» για απομόνωση ΕΣ, παρά τα μειονεκτήματα που έχει όπως ακριβά μηχανήματα, χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία καθώς και το ρίσκο οι τεράστιες φυγοκεντρικές δυνάμεις να καταστρέψουν τη δομή των κυστιδίων. (Kim et al., 2021).

2.6.2 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων βασισμένη στο μέγεθός τους

Η διάμετρος των ΕΣ (50 – 150 nm) είναι μικρότερη από αυτή των άλλων κυστιδίων όπως αποπτωτικά σωμάτια και αυτό αποτελεί τη βάση για το διαχωρισμό τους με τις βασισμένες στο μέγεθος τεχνικές. Αρκετές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί με τη μορφή του διαδοχικού φιλτραρίσματος, όπως υπερφιλτράρισμα (ultrafiltration - UC), χρωματογραφία SEC (size-exclusion chromatography) και γεγεθο-εξαρτώμενα συστήματα μικρο-ροής (microfluidics). Αυτές οι μέθοδοι, κυρίως το υπερφιλτράρισμα, είναι γρήγορες, πιο εύκολες και πιο φθηνές σε σύγκριση με την υπερφυγοκέντρωση. Στην UC όμως είναι δύσκολο να διαχωριστούν τα ΕΣ από προσμίξεις όπως πρωτεϊνικά συσσωματώματα, πχ αλβουμίνης. Στη SEC, χρησιμοποιούνται στήλες χρωματογραφίας που έχουν μεγάλη διαχωριστική ισχύ και παραλαμβάνουμε αρκετά καθαρό προϊόν, με απώλειες σε ποσότητα όμως. Μια διαφορετική τεχνική βασίζεται στην κατακρήμνιση των ΕΣ μέσω παγίδευσής τους σε «πολυμερικά δίκτυα» συγκεκριμένου μεγέθους. Αυτή είναι απλή και φθηνή τεχνική που θα μπορούσε να ενταχθεί και στα πλαίσια κλινικής εφαρμογής αφού μπορεί να φέρει μεγάλη ποσότητα ΕΣ σε μικρό χρόνο, αλλά πριν να μπορεί να γίνει αυτό θα πρέπει να λυθεί το θέμα με την πιθανή τοξικότητα των πολυμερών που χρησιμοποιούνται στα δίκτυα και με την επιμόλυνση με σωματίδια παρόμοιου μεγέθους όπως συσσωματώματα πρωτεϊνών ή άλλα κυστίδια (Kim et al., 2021).

2.6.3 Μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων που βασίζεται στην ανοσοσυνάφεια

Οι μεμβράνες των εξωσωμάτων έχουν συγκεκριμένη δομή και περιέχουν μεγάλες ποσότητες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η τεχνική της ανοσο-συνάφειας βασίζεται στην πρόσδεση τέτοιων πρωτεϊνών (αντιγόνα) με τα αντίστοιχα αντισώματά τους, ή με την αλληλεπίδραση υποδοχέων με τους προσδέτες τους (ligands). Στα σωματικά υγρά τα εξωσώματα είναι ανακατεμένα με πληθώρα άλλων στοιχείων, κάτι που κάνει τον διαχωρισμό και καθαρισμό τους μια ιδιαίτερη πρόκληση. Αυτή την πρόκληση έρχεται να αντιμετωπίσει η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης, που χρησιμοποιεί την επιλεκτική δύναμη των αντισωμάτων και των ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέων-προσδέτη ώστε να «κατεβάσουν» σχετικά καθαρό πληθυσμό ΕΣ από πολύπλοκο μείγμα. Ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένους μεμβρανικούς δείκτες των ΕΣ όπως anti-CD63 και anti-CD9 χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν δείχθει να είναι και πιο αποτελεσματικά από την υπερφυγοκέντρωση (Kim et al., 2021). Εταιρίες που δραστηριοποιούνται στο χώρο έχουν αναπτύξει και διάφορα κιτ απομόνωσης εξωσωμάτων, όπως το ExoQuick.

3. Σκοπός της Διπλωματικής

Η διπλωματική αυτή εργασία αποσκοπεί στην ανάλυση και παρουσίαση των πιο πρόσφατων σημαντικών ερευνητικών δεδομένων που αφορούν τα εξωσώματα και το ρόλο τους στην οστεοαρθρίτιδα. Τα εξωσώματα αποτελούν σημαντικό μέσο επικοινωνίας των κυττάρων και η επικοινωνία αυτή διαφαίνεται πως έχει εξέχουσα σημασία τόσο όσον αφορά την εξέλιξη αλλά και την αναχαίτιση της φλεγμονής που παρατηρείται στη νόσο. Ο ρόλος τους μπορεί να είναι διττός και το αν γέρνουν την πλάστιγγα υπέρ της επιθυμητής ομοιόστασης ή αντίθετα προς μια ανισορροπία που πυροδοτεί φλεγμονή, εξαρτάται κύρια από τον τύπο κυττάρων από τα οποία προέρχονται.

3.1 Μέθοδος αναζήτησης βιβλιογραφικών πηγών

Στο PubMed αναζητήθηκαν άρθρα με λέξεις κλειδιά “osteoarthritis” AND “exosomes” και ως φίλτρο τέθηκε αναζήτηση άρθρων με ημερομηνία δημοσίευσης από το 2018 έως και τα μέσα του 2021 Έγινε επιλογή των σημαντικότερων άρθρων ανασκόπησης (reviews). Επίσης αναζητήθηκαν και ερευνητικές δημοσιεύσεις της τελευταίας διετίας. Από περίπου 70 άρθρα που αναδείχθηκαν με βάση τα παραπάνω κριτήρια και φίλτρα, επελέγησαν 8 άρθρα, τα οποία ήταν δημοσιευμένα σε υψηλού κύρους περιοδικά και τα αποτελέσματα των οποίων αναλύθηκαν στο κύριο μέρος της διπλωματικής.

Επίσης, αναζητήθηκαν και κλινικές μελέτες με εξωσώματα στην οστεοαρθρίτιδα στο PUBMED αλλά και στην ιστοσελίδα www.clinicaltrials.gov.

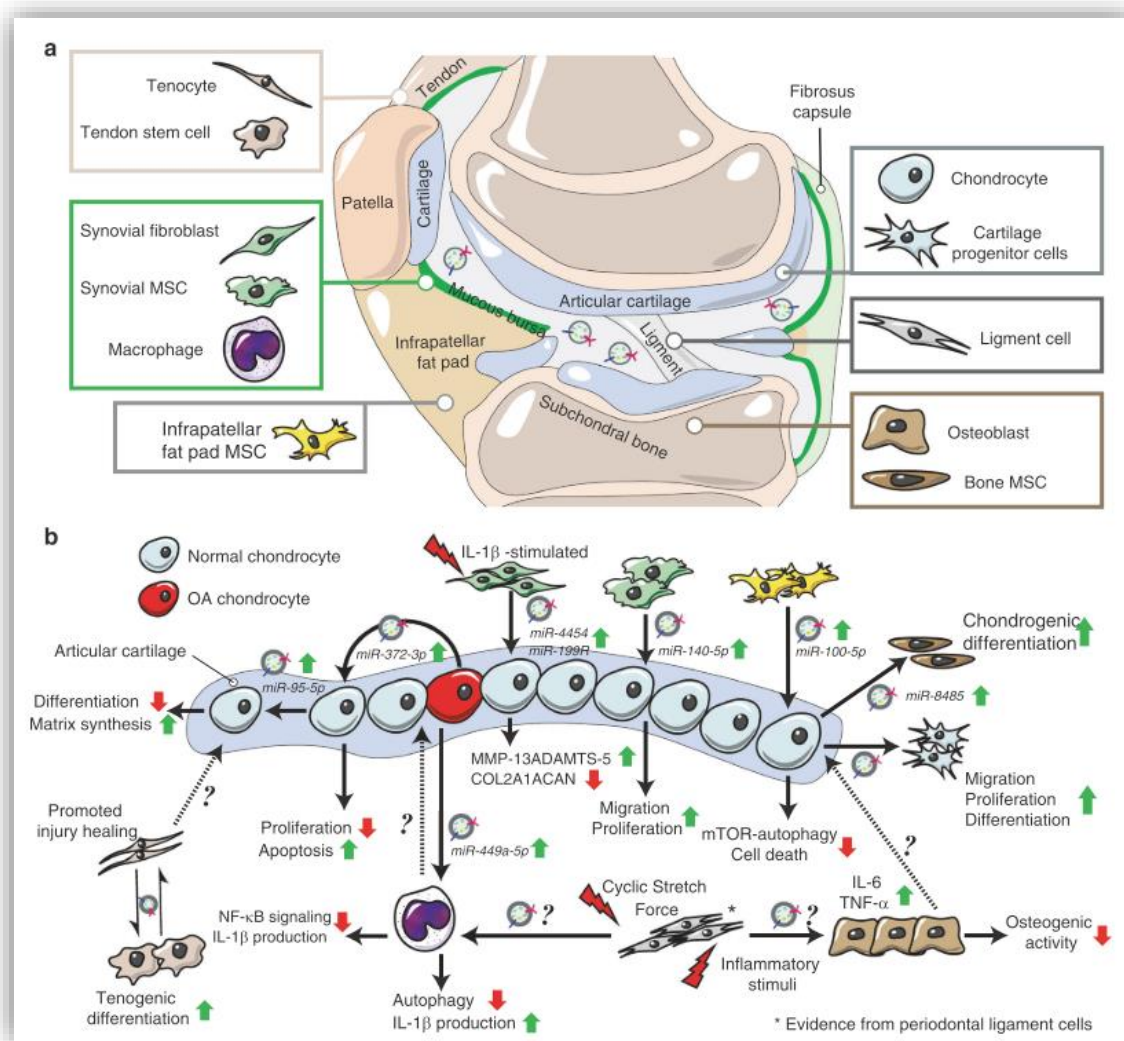
4. Κύριο Μέρος: Ανάλυση του Ρόλου των Εξωσωμάτων στην ΟΑ

4.1 Εξωσώματα στην παθολογία της ΟΑ, μια σύνοψη.

Σημαντικός όγκος μελετών τελευταία φανέρωσαν πως τα ΕΣ σχετίζονται στενά με την ΟΑ και έχουν ισχυρή θεραπευτική προοπτική για αυτή την ασθένεια. Η έρευνα με τα ΕΣ μπορεί να χωριστεί σε 2 κατευθύνσεις, μία που εστιάζει στη διαγνωστική σημαντικότητα και τις βιολογικές επιδράσεις των ενδογενών ΕΣ στην ΟΑ (**Εικόνα 8**) και μία άλλη που εστιάζει στα θεραπευτικά αποτελέσματα των ΕΣ από βλαστοκύτταρα και σε πιθανές μεθόδους βελτιστοποίησης τους (Ni et al., 2020).

Τα εξωσώματα έχουν ανιχνευθεί και στο αρθρικό υγρό και η σύστασή τους όπως και η ποσότητά τους αλλάζει με την εξέλιξη και την έκβαση της ΟΑ. Έχει δειχθεί ότι τα εξωσώματα είναι πολυπληθέστερα σε ΟΑ ασθενείς από ότι σε υγιείς και ότι φέρουν μεγαλύτερες ποσότητες κυτοκινών που πυροδοτούν ένα φαύλο κύκλο προσέλκυσης φλεγμονωδών κυττάρων του ανοσοποιητικού και παρεμπόδισης της χόνδρινης ανάπτυξης (Ni et al., 2020). Γενική παραδοχή αποτελεί ότι εξωσώματα από πάσχοντες ιστούς μεταφέρουν σήματα που χειροτερεύουν την εικόνα της νόσου, ενώ εξωσώματα από βλαστοκύτταρα παρέχουν τροφικούς παράγοντες και προωθούν την ομοιοστάση, προάγοντας την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου καθώς και τη στροφή προς λιγότερο επιθετικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας (πχ μακροφάγα). Φαίνεται επομένως πως τα ΕΣ παίζουν δηλαδή διττό ρόλο στην ΟΑ, ανάλογα με την κυτταρική τους προέλευση (Asghar et al., 2020; Bousnaki et al., 2020; Cheng et al., 2017; D'Arrigo et al., 2019; Ju et al., 2019; Kim et al., 2021; Li et al., 2018; Xie et al., 2020; Zhou et al., 2020a, 2020b).

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η ευεργετική επίδραση που πολλές έρευνες έχουν δείξει για τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα στην ΟΑ θεωρείται πως στηρίζεται στην παρακρινή δράση των κυττάρων αυτών παρά στην ίδια διαφοροποίηση τους και εγκατάσταση στο χόνδρο. Από αυτό δικαιολογείται και η ιδιαίτερη έμφαση που δίνεται σε μελέτες των εξωσωμάτων και το κατά πόσον η συλλογή και χορήγησή τους στη νόσο, είναι σε θέση να επιφέρει θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς την ανάγκη έγχυσης ζωντανών κυττάρων (Esmaeili et al., 2021; Fuloria et al., 2021; Ng et al., 2020; Ragni et al., 2020).



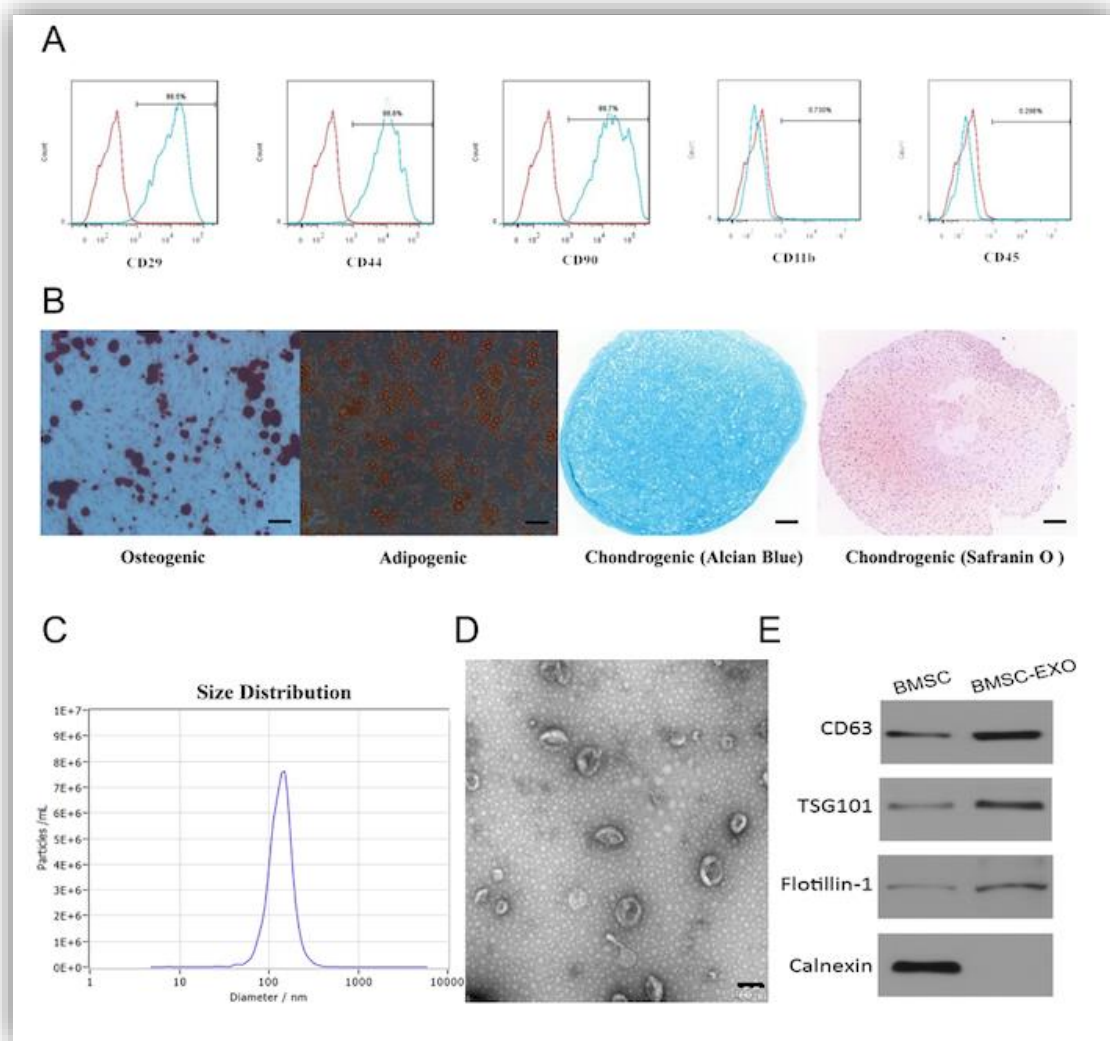
Εικόνα 8. Τα ΕΣ από διάφορους ιστούς στην ΟΑ και τα βιολογικά τους αποτελέσματα

α) Τα εξωσώματα μπορούν να ανιχνευθούν στην αρθρική κοιλότητα και αλλάζουν κατά την πρόοδο της ΟΑ. Πλήθος κυτταρικών τύπων όπως χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, αρθρικά μεσεγχυματικά κύτταρα και ινοβλάστες όπως και τενοκύτταρα και βλαστικά των τενόντων παράγουν και απελευθερώνουν ΕΣ που μπορεί να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αρθρικής ομοιόστασης. β) Τα ΕΣ από τα διαφορετικά κύτταρα στην άρθρωση συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία σε πολύπλοκα δίκτυα και ρυθμίζουν ποικίλες διεργασίες όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, διαφοροποίηση, αυτοφαγία, σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας, φλεγμονώδη αντίδραση κ.α (Ni et al., 2020).

4.2 Εξωσώματα από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μυελού των οστών προωθούν την επιδιόρθωση του χόνδρου και απαλύνουν τον πόνο σε μοντέλο ΟΑ αρουραίου.

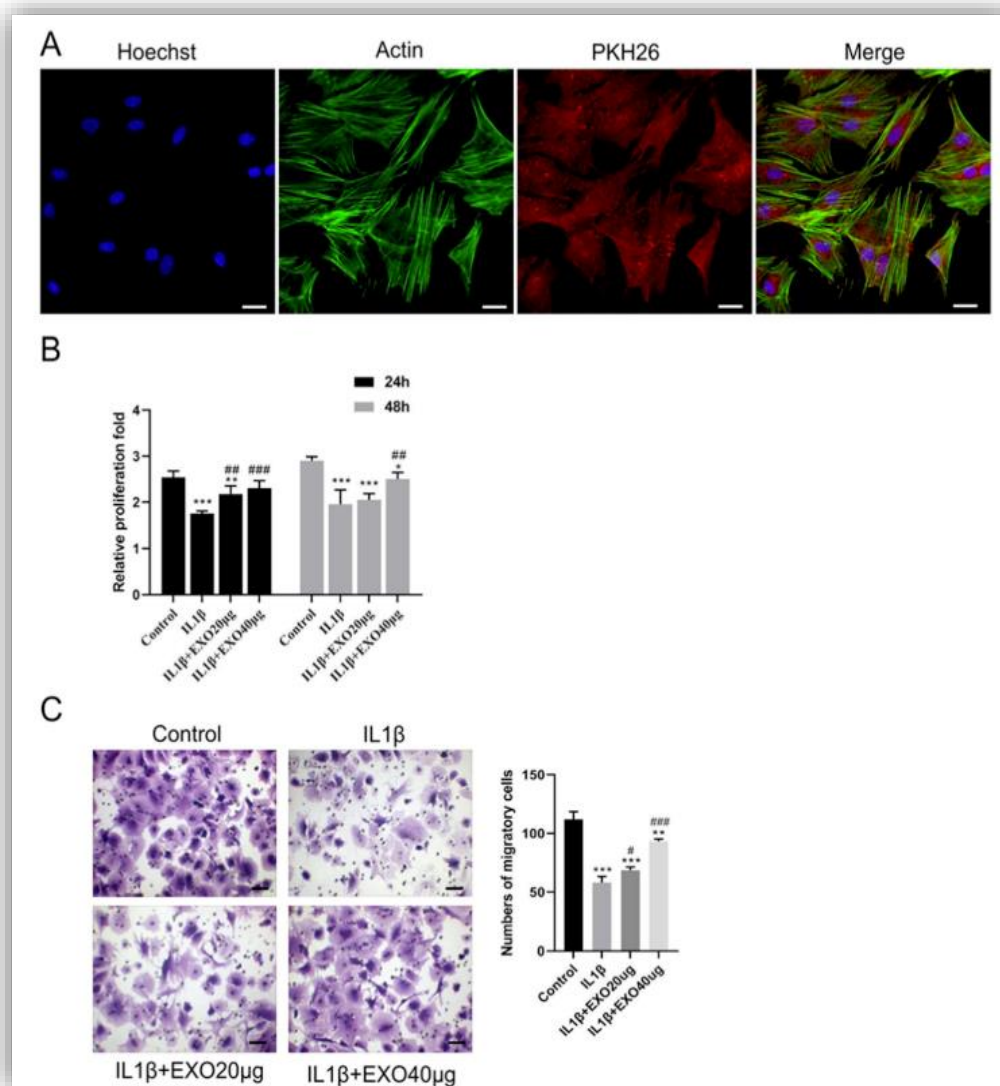
Μία πρόσφατη μελέτη με εξωσώματα των He και συν. (2020) έδειξε πως εξωσώματα από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών, προστάτεψαν από χόνδρινες βλάβες και απαλύναν τον πόνο στα γόνατα σε ένα μοντέλο ΟΑ στον αρουραίο, μετά από έγχυσή τους στην πάσχουσα άρθρωση (He et al., 2020). Αρχικά οι ερευνητές απομόνωσαν εξωσώματα από τα

μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και προέβησαν στον λεπτομερή χαρακτηρισμό τους (**Εικόνα 9**). Στη συνέχεια προέβησαν σε *in vitro* πειράματα με χονδροκύτταρα στα οποία είχε επαχθεί ο οστεοαρθριτικός φαινότυπος μετά από χορήγηση IL-1β (κλασσικός τρόπος μοντελοποίησης OA *in vitro*) και παρατηρήθηκε ότι τα εξωσώματα από τα MSCs αφενός μεν εισέρχονται στα κύτταρα κάνοντας βιοδιαθέσιμο το φορτίο τους, αφετέρου βελτιώνουν τον πολλαπλασιασμό/ανάπλαση των χονδροκυττάρων καθώς και την μεταναστευτική τους ικανότητα (**Εικόνα 10**). Υπό την επίδραση των εξωσωμάτων παρατηρήθηκε επαναφορά της παραγωγής κολλαγόνου τύπου II, το οποίο σταδιακά μειώνεται στην OA, ενώ παράλληλα μειώθηκε η παραγωγή της εξωκυττάριας μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-13 η οποία είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση του κολλαγόνου II (**Εικόνα 11**). Αφού απέδειξαν την ευεργετική δράση των ΕΣ *in vitro*, προχώρησαν με τη διερεύνηση του ρόλου τους σε *in vivo* μοντέλο της OA στον αρουραίο. Η πειραματική επαγωγή OA επιτεύχθηκε με έγχυση ιωδο-οξικού νατρίου (sodium iodoacetate) το οποίο προκαλεί φλεγμονή στο γόνατο και προσομοιάζει τον φαινότυπο της ασθένειας. Υπήρξαν 3 ομάδες πειραματόζωων: 1) εκείνα στα οποία δεν έγινε καμία παρέμβαση, 2) άλλα στα οποία χορηγήθηκε μόνο η ουσία για την πρόκληση OA και 3) η ομάδα παρέμβασης, στην οποία προκλήθηκε OA και παράλληλα δίνονταν 40mg εξωσώματα από μεσεγχυματικά κάθε βδομάδα. Τα ζώα εξετάστηκαν μετά από 6 βδομάδες αρθροσκοπικά και ιστολογικά και παρατηρήθηκε βελτίωση του OA φαινοτύπου στα ζώα που είχαν δεχθεί και τα ΕΣ (He et al., 2020) (**Εικόνα 12**). Ήταν επίσης εντυπωσιακό το ότι επιβεβαίωσαν ανάπλαση του χόνδρου κατόπιν επίδρασης των ΕΣ και έδειξαν πως *in vivo* συμβαίνει ότι είχαν παρατηρήσει και *in vitro* στις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων, δηλαδή αύξηση του COL2A1 με ταυτόχρονη μείωση της έκκρισης MMP-13. Επιπροσθέτως, έδειξαν και με μετρήσεις με ELISA από τον ορό των αρουραίων, ότι κυτοκίνες φλεγμονής όπως οι IL-1β, IL-6 και TNFα μειώνονται, ενώ παρατηρείται ελαφρά αύξηση της IL-10 που έχει αντί-φλεγμονώδη και ανοσορυθμιστικό ρόλο (He et al., 2020). Τέλος, σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε και μείωση του πόνου στα ζώα, με τα ζώα που είχαν λάβει ΕΣ να δείχνουν καλύτερη αντίδραση από αυτά που δεν είχαν λάβει, προσεγγίζοντας την συμπεριφορά των αρουραίων που δεν είχαν OA (He et al., 2020). Στους περιορισμούς της μελέτης συγκαταλέγεται η έλλειψη διερεύνησης του εμπλεκόμενου μοριακού μηχανισμού ή της σηματοδοτικής οδού που ενεργοποιείται για να υπάρξει αυτό το αποτέλεσμα. Η θεραπευτική επίδραση των συγκεκριμένων ΕΣ θα πρέπει να δειχθεί και στα πλαίσια μιας κλινικής μελέτης μελλοντικά. Τα αποτελέσματα πάντως είναι ελπιδοφόρα για τη πιθανή μελλοντική ανάπτυξη θεραπευτικής προσέγγισης για την OA. (He et al., 2020).



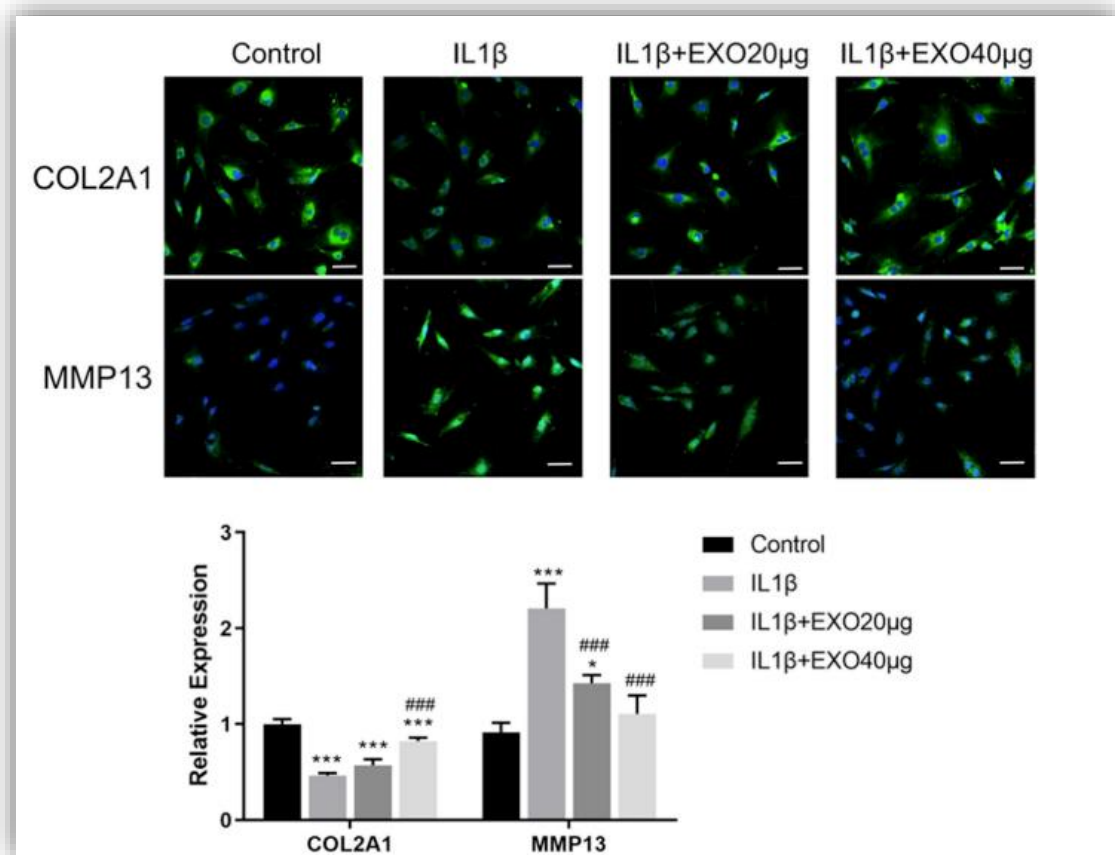
Εικόνα 9. Χαρακτηρισμός των μεσεγχυματικών κυττάρων μυελού και των παραγόμενων εξωσωμάτων τους. (He et al., 2020).

A) Οι επιφανειακοί δείκτες των μεσεγχυματικών, ανάλυση με FACS. Οι κόκκινες καμπύλες δείχνουν το σήμα των isotype control των αντισωμάτων. Οι πράσινες καμπύλες δείχνουν το ειδικό σήμα του αντισώματος έναντι του εκάστοτε δείκτη. Τα MSCs είναι θετικά στους δείκτες CD29, CD44 και CD90, ενώ είναι αρνητικά για τους μη-μεσεγχυματικούς δείκτες CD11b, CD45. B) Στο πάνελ B φαίνονται χρωστικές που βάφουν ειδικά τέτοιους τύπους κυττάρων C) απεικονίζεται το ιστόγραμμα μεγέθους των απομονωμένων εξωσωμάτων (30 με 150 nm διάμετρο). D) Χαρακτηριστική εικόνα των εξωσωμάτων όπως φαίνονται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. E) Πρωτεϊνικοί δείκτες των εξωσωμάτων με μέθοδο Western blot. Στην πρώτη στήλη τα μητρικά κύτταρα, στην δεύτερη τα εξωσώματά τους. Τα εξωσώματα περιέχουν τους θετικούς δείκτες CD63, TSG101 και flotillin-1 (βλέπουμε έντονη μπάντα) ενώ απουσιάζει από αυτά ο μη-εξωσωμικός δείκτης Calnexin.



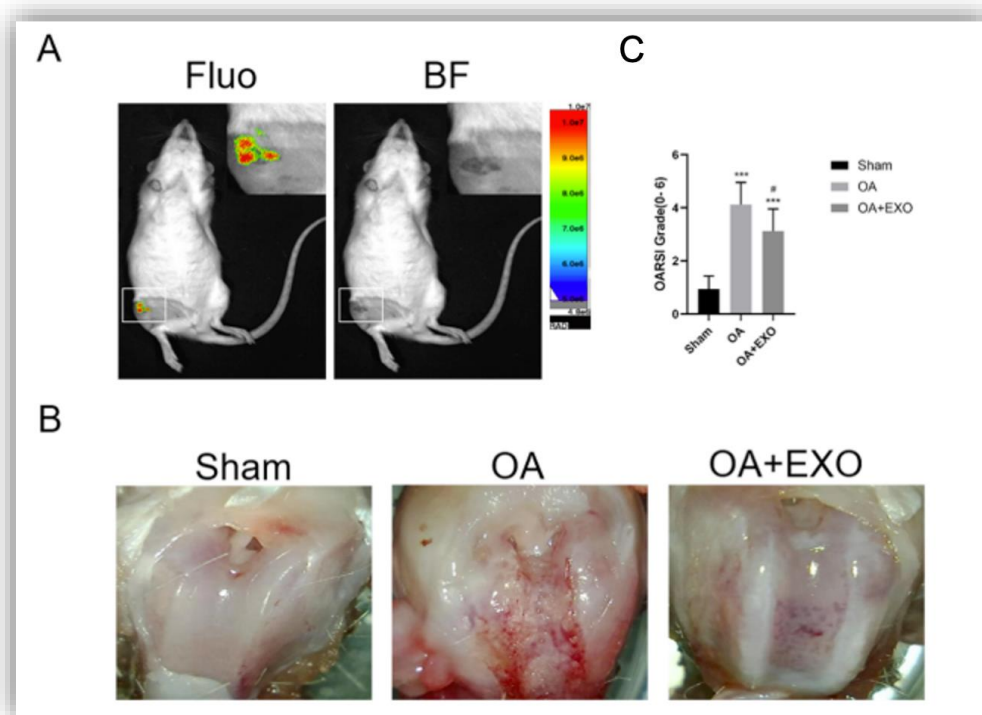
Εικόνα 10. Η επίδραση των εξωσωμάτων από μεσεγχυματικά του μυελού σε καλλιεργούμενα χονδροκύτταρα με επαγωγή OA φαινότυπου. (He et al., 2020).

A) Τα εξωσώματα εισέρχονται στα χονδροκύτταρα: Με DAPI (μπλε) ο πυρήνας των χονδροκυττάρων, με πράσινο η ακτίνη στο κυτταρόπλασμα, με κόκκινο η PKH26 που αποτελεί δείκτη των εξωσωμάτων. B) Η επώαση με εξωσώματα βελτιώνει/αποκαθιστά την ικανότητα πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. C) Χρώση των χονδροκυττάρων που έχουν μεταναστεύσει σε transwell assay. Το Control δείχνει τη συμπεριφορά στο baseline χωρίς OA φαινότυπο. Με IL-1 β επάγεται φλεγμονώδης OA φαινότυπος και η κινητικότητα των χονδροκυττάρων μειώνεται σημαντικά. Με προσθήκη εξωσωμάτων (ΕΣ), διακρίνεται βελτίωση, που αποτυπώνεται και στο διπλανό γράφημα.



Εικόνα 11. Η επίδραση των ΕΣ στην παραγωγή αναβολικών (*COL2A1*) και καταβολικών (*MPP-13*) δεικτών στα χονδροκύτταρα. (He et al., 2020).

Εικόνες από μικροσκοπίου δείχνουν ότι το πράσινο σήμα για το κολλαγόνο έχει σημαντικά εξασθενήσει μετά από την προσθήκη IL-1β. Όπως μετά τη χορήγηση εξωσωμάτων η εικόνα βελτιώνεται. Αντίθετη εικόνα φαίνεται για τον δείκτη καταβολισμού MMP-13, που αυξάνεται έντονα μετά από επαγωγή ΟΑ φαινοτύπου με IL-1β αλλά αφού προστεθούν και τα εξωσώματα, φαίνεται το πράσινο σήμα για την έκφραση του καταβολικού ενζύμου να μειώνεται εντυπωσιακά. Στο γράφημα από κάτω αποτυπώνονται τα παραπάνω και με σχετική ποσοτικοποίηση.

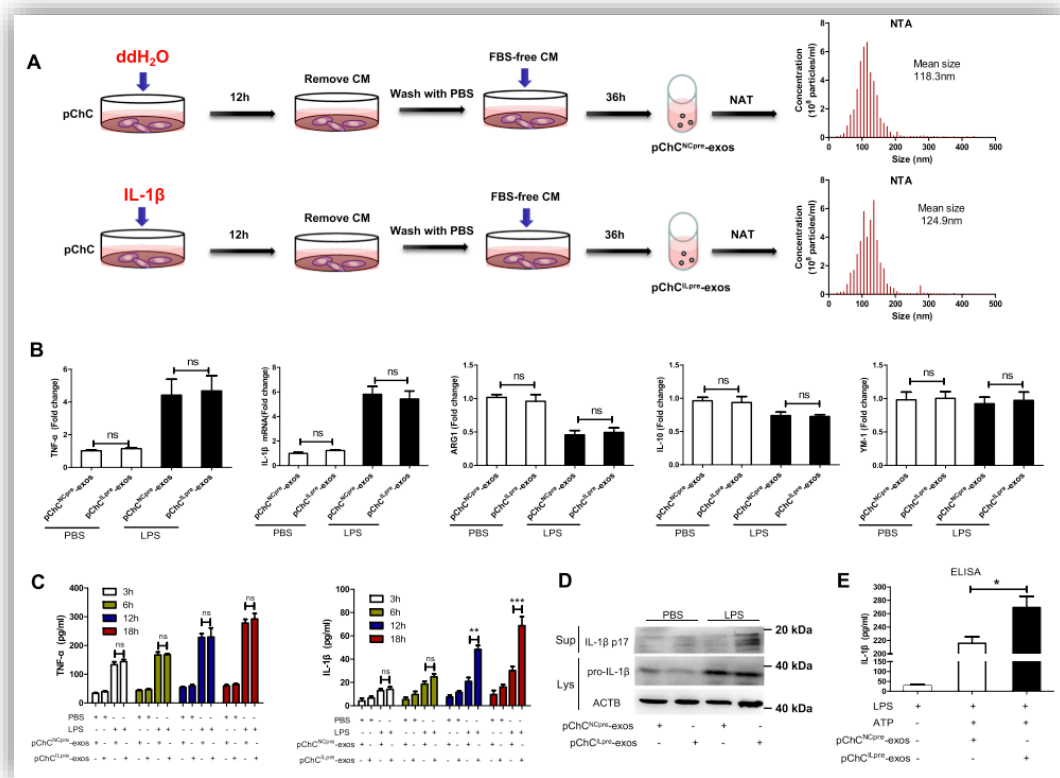


Εικόνα 12. Η ένεση εξωσωμάτων από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα στην άρθρωση αρουραίων με OA βελτιώνει τον φαινότυπο.

A) Με φθορισμό εντοπίζεται η συγκέντρωση των ΕΣ στο αρθρικό υγρό. Β) Η αρθροσκοπική εικόνα όπου γίνεται εμφανής η μείωση της βλάβης στην OA άρθρωση που έχει δεχθεί και την επίδραση των ΕΣ. C) Ποσοτικοποίηση της βελτίωσης αυτής μέσω του OARSI score (Osteoarthritis Research Society International).

4.3 Εξωσώματα από OA χονδροκύτταρα προκαλούν αυξημένη έκκριση IL-1β από μακροφάγα και επιδεινώνουν την φλεγμονή του αρθρικού υμένα.

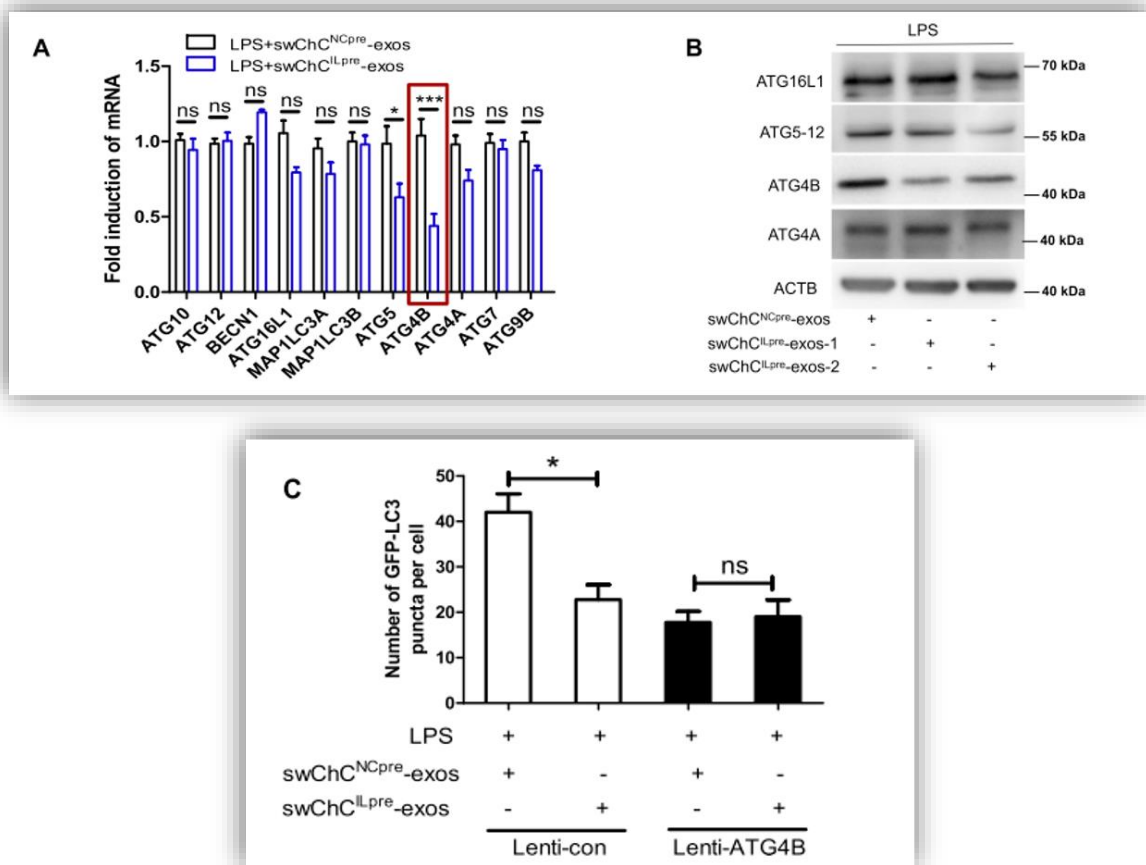
Οι Ni και συν. (2019) έδειξαν πως τα ΕΣ δεν είναι κατ' ανάγκη ευεργετικά στην OA, αλλά εξαρτάται από που προέρχονται καθώς και ότι ΕΣ προερχόμενα από OA χονδροκύτταρα προκαλούν προ-φλεγμονώδη στρόφη στα μακροφάγα του αρθρικού υμένα (Ni et al., 2019). Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές απομόνωσαν ΕΣ από υγιή χονδροκύτταρα αλλά και από κύτταρα που είχαν δεχθεί επίδραση IL-1β προκειμένου να εμφανίσουν OA φαινότυπο. Κατόπιν έγινε επώαση μακροφάγων του αρθρικού υμένα *in vitro* με τα ΕΣ που είχαν απομονωθεί και διερεύνησαν διάφορους παράγοντες φλεγμονής. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13** παρατηρήθηκε πως όταν τα αρθρικά μακροφάγα διεγείρονται με LPS (βακτηριακή πρωτεΐνη που ενεργοποιεί υποδοχείς στα μακροφάγα) και επιπροσθέτως δέχονται την επίδραση εξωσωμάτων από χονδροκύτταρα στα οποία έχει επαχθεί φλεγμονή (μετατροπή σε OA χονδροκύτταρα), τότε εκκρίνουν περισσότερη κυτοκίνη IL-1β και παρουσιάζουν φλεγμονώδη φαινότυπο (Ni et al., 2019).



Εικόνα 13. Εξωσώματα από ΟΑ χονδροκύτταρα επάγουν έκκριση προ-φλεγμονώδους *IL-1β* από μακροφάγα. (Liu et al., 2018).

A) Μέθοδος απομόνωσης ΕΣ από χονδροκύτταρα που είτε έχουν επωαστεί με *IL-1β* για επαγωγή ΟΑ, είτε χωρίς. Εμφανίζουν παρόμοια κατανομή μεγέθους. B) Σε επίπεδο RNA (RT-PCR) φαίνεται παρόμοια αύξηση του mRNA για *TNFα* και για *IL-1β* στα μακροφάγα που διεγέρθηκαν με LPS και δέχθηκαν την επίδραση ΕΣ είτε από υγιά (NC-pre) είτε από ΟΑ χονδροκύτταρα (IL-pre). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά. C) Τα επίπεδα πρωτεΐνης που εκκρίνεται μετρήθηκαν με ELISA. Εδώ διακρίνεται η διαφορά ότι ενώ σύμφωνα με το B τα επίπεδα mRNA είναι παρόμοια, η επώαση με ΕΣ από ΟΑ χονδροκύτταρα επάγει μεγαλύτερη έκκριση της *IL-1β* στον εξωκυττάριο χώρο (2^ο πάνελ στο C). Στο D φαίνεται πως ενώ τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της *IL-1β* είναι ίδια και στις 2 περιπτώσεις των LPS διεγερμένων μακροφάγων, στην περίπτωση των IL-pre exos φαίνεται στο υπερκείμενο (Sup) μεγαλύτερη ποσότητα εκκρινόμενης κυτοκίνης. Αυτό ποσοτικοποιείται στο γράφημα στο E όπου η μέτρηση δίνεται ως pg/ml.

Ως πιθανή εξήγηση δόθηκε η μειωμένη αυτοφαγία που εμφανίζουν τα μακροφάγα υπό την επίδραση των ΕΣ από τα ΟΑ χονδροκύτταρα, η οποία ανιχνεύθηκε τόσο με την έκφραση της LC3, πρωτεΐνη δείκτη της αυτοφαγίας, η οποία εμφανίστηκε μειωμένη στην προαναφερθείσα κατάσταση όσο και με μικροσκοπικό προσδιορισμό των κοκκίων LC3 (Ni et al., 2019). Κατόπιν ελέγχθηκε και η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία και βρέθηκε ότι το *ATG4B* παίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση της αυτοφαγίας που προκαλείται από τα ΟΑ εξωσώματα στα μακροφάγα ((Ni et al., 2019) και **Εικόνα 14**).

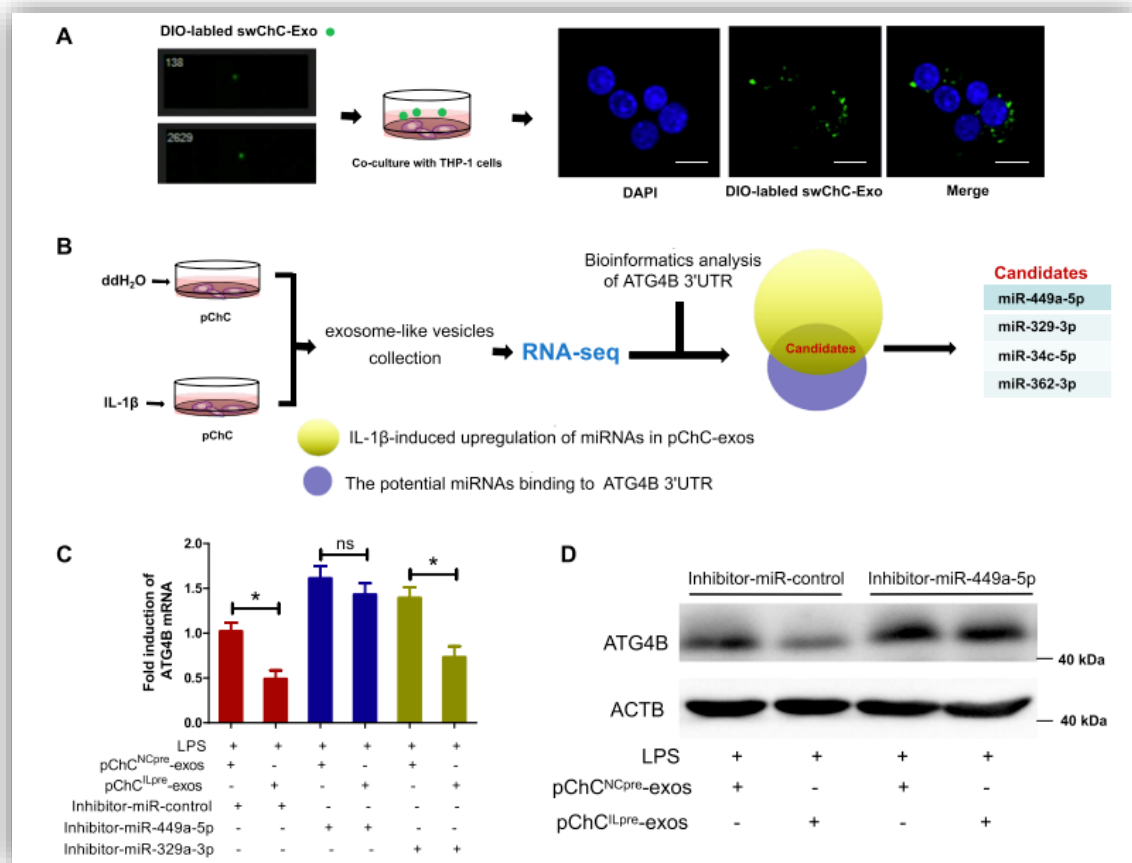


Εικόνα 14. Το αυτοφαγικό γονίδιο *ATG4B* εμπλέκεται στη μείωση της αυτοφαγίας που παρατηρείται στα μακροφάγα μετά την επίδραση ΕΣ από ΟΑ χονδροκύτταρα.

A) Με RT-PCR εντοπίστηκε μείωση της σχετικής έκφρασης του *ATG4B* όταν επιδρούν τα ΟΑ εξωσώματα (ILpre exos) στα μακροφάγα. B) Αυτό δείχθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με Western blot (μεσαίο πάνελ, εξασθενημένη μπάντα στη 2^η και 3^η στήλη σε σχέση με την 1^η που είναι το κοντρόλ δείγμα. C) Προσδιορισμός του αριθμού των LC3 κοκκίων (puncta) με το μικροσκόπιο. Τα LC3 κοκκία αυξάνονται όταν έχουμε αυτοφαγία. Με τα ILpre ΕΣ επέρχεται μείωση σε σχέση με τα NCpre, αλλά αυτή η σχέση φαίνεται να εξαρτάται από το *ATG4B*. Όταν το *ATG4B* αποσιωπάται με λεντιού (Lenti-*ATG4B*) τότε δε υπάρχει διαφορά μεταξύ των 2 περιπτώσεων (μαύρες μπάρες). (Ni et al., 2019)

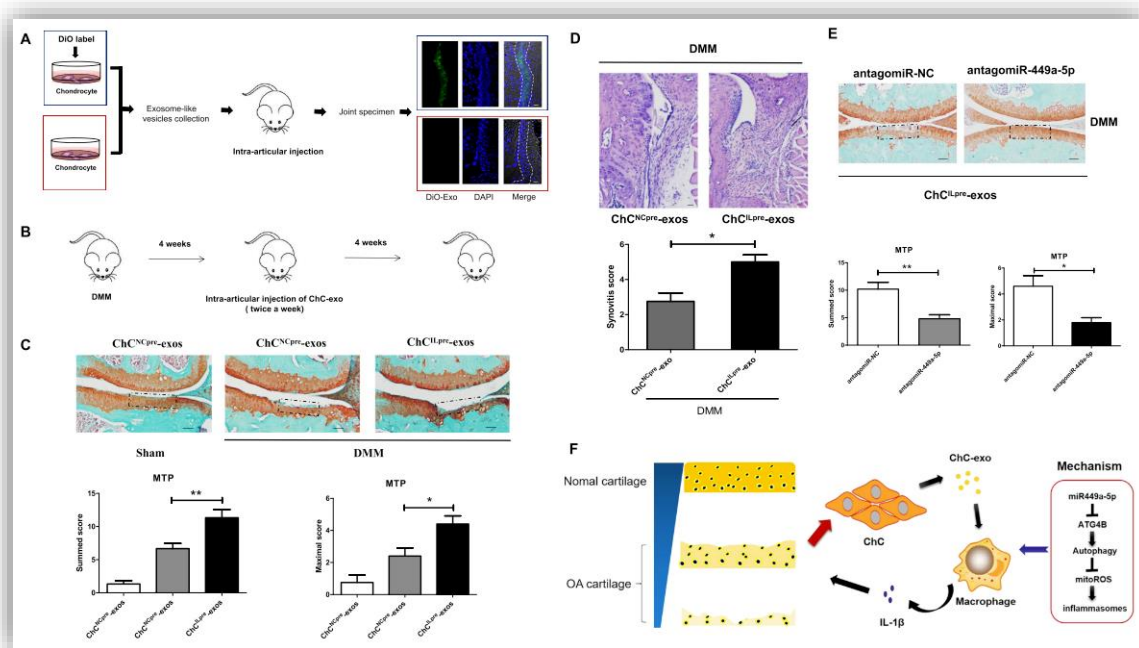
Στη συνέχεια διερευνήθηκαν πιθανά microRNAs στα ΕΣ που μπορεί να ευθύνονται για τη μείωση της έκφρασης του *ATG4B* και τη συνεπακόλουθη εξασθένηση της αυτοφαγίας που συνεπικουρεί στην αυξημένη έκκριση IL-1β και τον φλεγμονώδη φαινότυπο. Απομόνωσαν ΕΣ από mock και από χονδροκύτταρα μετά από επώαση με IL-1β, προέβησαν σε RNA-seq ανάλυση των περιεχόμενων μορίων RNA και ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση για ανεύρεση μοτίβων που αναδεικνύουν τη δυνατότητα να προσδεθούν στο 3' άκρο του mRNA του γονιδίου στόχου, δηλαδή του *ATG4B*. (Ni et al., 2019). Στην **Εικόνα 15** αποτυπώνεται η συγκεκριμένη διαδικασία και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αναφέρουν πως το miR-449-5p που περιέχεται στα εξωσώματα από τα ΟΑ χονδροκύτταρα, οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του *ATG4B* και επακόλουθη μείωση της αυτοφαγίας στα μακροφάγα, ενώ όταν το miR-449-5p

εμποδίζεται από ειδικό αναστολέα, τότε η επίδραση αυτή ακυρώνεται (**Εικόνα 15**, C&D). Εν συνεχεία, ακολούθησαν *in vivo* πειράματα σε ποντίκια στα οποία είχαν επάγει ΟΑ μετά από χειρουργική ρήξη μηνίσκου (Destabilization of the medial meniscus – DMM). Όταν σε αυτά τα ποντίκια χορηγήθηκε ενδοαρθρική ένεση και τα ΕΣ από χονδροκύτταρα που είχαν στραφεί προς φλεγμονή με χορήγηση IL-1β, τότε παρατήρησαν χειροτέρευση της φθοράς του χόνδρου, και της φλεγμονής της αρθρικής μεμβράνης, ισχυροποιώντας την υπόθεσή τους (**Εικόνα 16**). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, το miR-499-5p αυξάνεται στα ΟΑ χονδροκύτταρα και εισέρχεται σε εξωσώματα, τα οποία στη συνέχεια συλλέγονται από μακροφάγα του αρθρικού υμένα, στα οποία προκαλείται μείωση της αυτοφαγίας μέσω της μείωσης της έκφρασης του *ATG4B* και επακόλουθη αύξηση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-1β που πυροδοτεί επιδείνωση της πάθησης (Ni et al., 2019).



Εικόνα 15. Το miR-449-5p συμβάλλει στην μείωση της έκφρασης του *ATG4B* από τα *ILpre* εξωσώματα. (Ni et al., 2019)

A) Φθορίζοντα ΕΣ φαίνονται να εισέρχονται μέσα στα μακροφάγα. Β) Σχηματικά η διαδικασία απομόνωσης των ΕΣ, η ανάλυση με RNA-seq και η αναζήτηση σε αυτά τα δεδομένα μορίων στόχων που έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το 3' άκρο του mRNA του *ATG4B*. C&D) Ενδείξεις σε επίπεδο τόσο mRNA (C) όσο και πρωτεΐνης (D) ότι το microRNA 449-5p ευθύνεται για τη μείωση της έκφρασης του *ATG4B*. Όταν χρησιμοποιείται αναστολέας ειδικός για το miR-449-5p, η επίδραση αυτή εξαφανίζεται.



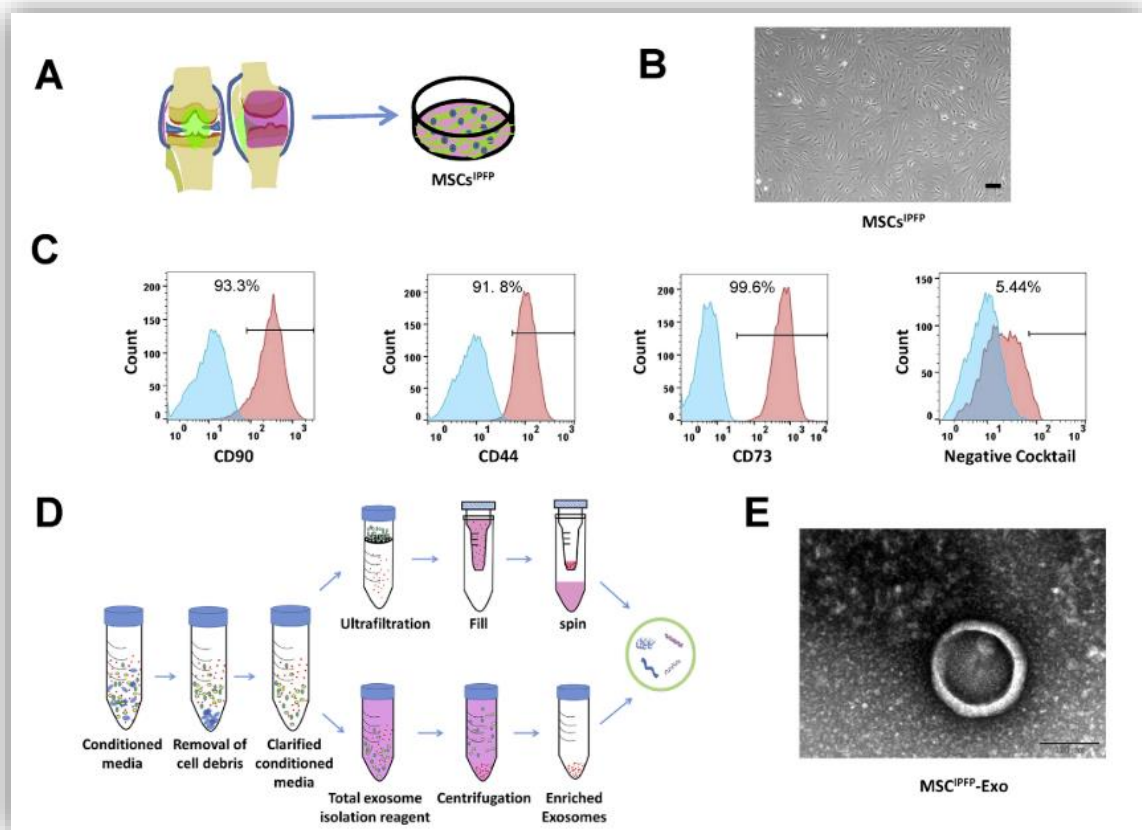
Εικόνα 16. Η ενδοαρθρική έγχυση ΕΣ από IL-1-pre χονδροκύτταρα επιδεινώνει την φθορά του χόνδρου και τη φλεγμονή στα DMM-επαγόμενα ΟΑ ποντίκια. (Ni et al., 2019).

A) Τα ΕΣ που απομονώθηκαν από χονδροκύτταρα σημάνθηκαν με DiO φθορίζουσα χρωστική (ή όχι για κοντρόλ) και εντοπίζονται να συσσωρεύονται στο αρθρικό υγρό κατόπιν έγχυσης. B) Το πειραματικό μοντέλο: (DMM-OA). 4 βδομάδες αργότερα έγιναν οι εγχύσεις των ΕΣ, 2 φορές τη βδομάδα για ένα μήνα και κατόπιν οι αρθρώσεις εξετάστηκαν ιστολογικά. C) Σε σχέση με τα κοντρόλ, διαφαίνεται μεγαλύτερη φθορά στο χόνδρο (πορτοκαλί – Safranin O χρώση) στα ποντίκια που εκτός από δημιουργία ΟΑ μέσω DMM δέχτηκαν και IL-1-pre ΕΣ. D) Παρατηρείται μεγαλύτερη φλεγμονή με διήθηση μακροφάγων στα ποντίκια που πήραν τα IL-1-pre ΕΣ, ενώ στο D) επέρχεται βελτίωση της εικόνας (μεγαλύτερο διάστημα μεταξύ των 2 επιφανειών) όταν επιπροσθέτως χρησιμοποιηθεί antagomiR του miR-499-5p. F) Το μοντέλο υπόθεσης που υποστηρίζεται από τα παραπάνω δεδομένα.

4.4 Εξωσώματα από MSC προστατεύουν τον αρθρικό χόνδρο και βελτιώνουν τον ΟΑ φαινότυπο μέσω αναστολής του mTOR από το miR-100-5p.

Μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη των Wu και συν. (2019) έδειξε πως ΕΣ από MSC που εδράζονται μέσα στην άρθρωση και συγκεκριμένα MSC του λιπώδους μαξιλαριού της επιγονατίδας (infrapatellar fat pad – IFPP), συμβάλλουν στην ομοίωση του χόνδρου και βελτιώνουν την παθολογική εικόνα στην ΟΑ (Wu et al., 2019). Συγκεκριμένα, σε αντιδιαστολή με την επίδραση στη μείωση της αυτοφαγίας των μακροφάγων που είχαν τα ΕΣ από τα χονδροκύτταρα στη μελέτη των Ni et al., 2019, (Ni et al., 2019) οι Wu και συν. αναφέρουν ότι τα ΕΣ από τα IFPP-MSCs βελτίωσαν σημαντικά την αυτοφαγία στα χονδροκύτταρα στα οποία τα χορήγησαν, μέσω παρεμπόδισης του mTOR μονοπατιού από το miR-100-5p (Wu et al., 2019).

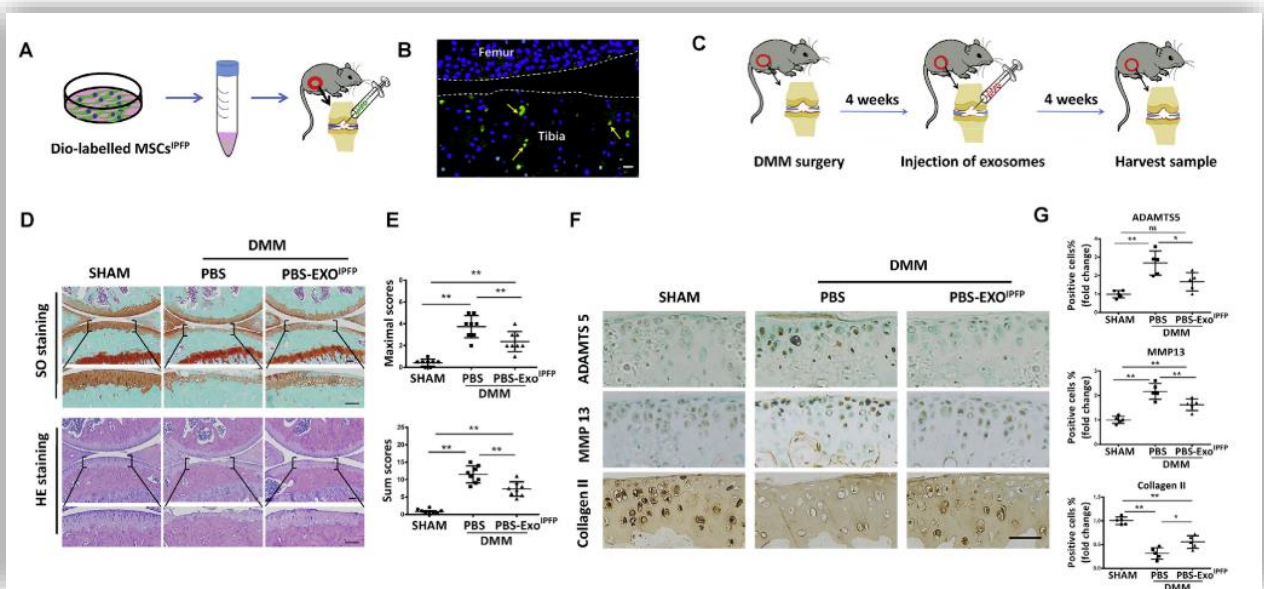
Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ΕΣ από ανθρώπινα IFPP-MSCs και 2 μέθοδοι απομόνωσης των ΕΣ (υπερφυγοκέντρηση και ExoQuick στήλη ανοσο-συνάφειας), οι οποίες δεν έδειξαν διαφορά ως προς τα χαρακτηριστικά των ΕΣ και τα οποία είχαν την ίδια μορφολογία και κατανομή μεγέθους και εμφάνιζαν τους ίδιους εξωσωμικούς δείκτες (CD81, CD9, CD63), όπως φαίνεται στην (Εικόνα 17). Η επαγωγή της ΟΑ στα ποντίκια έγινε με τη μέθοδο της χειρουργικής ρήξης του συνδέσμου του μηνίσκου (DMM).



Εικόνα 17. Απομόνωση εξωσωμάτων από IFPP-MSCs και χαρακτηρισμός τους. (Wu et al., 2019).

A) Μεσεγχυματικά καλλιεργούνται από το λιπώδες μαξιλάρι της επιγονατίδας. B) Τα MSC όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο. C) Οι δείκτες των MSC με ανάλυση FACS. Οι κόκκινες καμπύλες δείχνουν τη χρώση με τα ειδικά αντισώματα για τους δείκτες, οι γαλάζιες είναι τα αντίστοιχα isotype controls που δίνουν τη μη ειδική χρώση. Οι καμπύλες για τα CD90, CD44 και CD73 είναι μετατοπισμένες προς τα δεξιά, αναδεικνύοντας ότι τα κύτταρα που απομονώθηκαν είναι στην πλειοψηφία τους θετικά για τους MSC δείκτες αυτούς, ενώ δεν δίνουν εμφανίζουν σήμα με το αρνητικό κοκτέιλ. D) Οι 2 μέθοδοι απομόνωσης σχηματικά, οι οποίες καταλήγουν σε παραπλήσιο αποτέλεσμα (υπερφυγοκέντρηση (κάτω) ή εκχύλιση από κολώνα ανοσοσυνάφειας (πάνω)). E) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που δείχνει τη χαρακτηριστική μορφή κούπας (cup-shaped) ενός εξωσώματος.

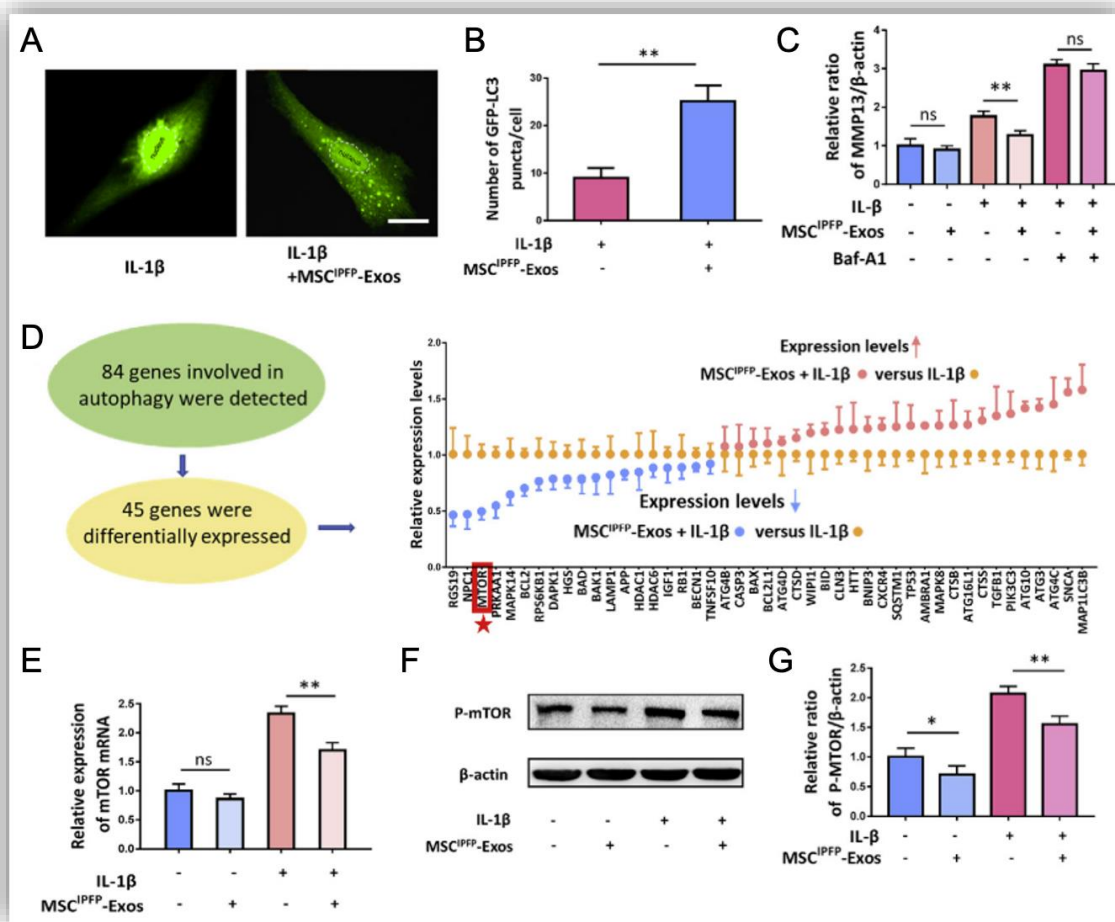
Σε ποντίκια που απέκτησαν ΟΑ μετά από την αποσταθεροποίηση του μηνίσκου (DMM ΟΑ μοντέλο), έγινε ενδοαρθρική έγχυση των ΕΣ προερχόμενων από τα IFPP-MSCs. Ως κοντρόλ, υπήρξε ομάδα στην οποία έγινε απλώς έγχυση με φωσφορικό διάλυμα (PBS) (Εικόνα 18). Παρατηρήθηκε ιστολογική βελτίωση της άρθρωσης αλλά και ελάττωση των καταβολικών ενζύμων ADAMTS5, MMP-13 με παράλληλη αύξηση του κολλαγόνου τύπου ΙΙ, ένδειξη ανάπλασης του χόνδρου (Εικόνα 18 (Wu et al., 2019)). Αξιοσημείωτο ήταν και το ότι καταγράφηκε βελτίωση στη συμπεριφορά και τη βάρδιση των ζώων.



Εικόνα 18. Τα ΕΣ από IFPP-MSC εμποδίζουν σημαντικά την χόνδρινη καταστροφή. (Wu et al., 2019)

A) σχεδιάγραμμα της ενδοαρθρικής έγχυσης. B) Απορρόφηση των ΕΣ στην άρθρωση. Τα κίτρινα βέλη καταδεικνύουν φθορίζοντα ΕΣ και η διακεκομμένη γραμμή τα όρια των επιφανειών της άρθρωσης. C) Σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας θεραπείας με ΕΣ. D) Ιστολογική μελέτη όπου διαφαίνεται βελτίωση της εικόνας της άρθρωσης στο δείγμα που προέρχεται μετά από έγχυση εξωσωμάτων. E) Ποσοτικοποίηση με σκορ της προηγούμενης παρατήρησης. F) Ανοσο-ιστοχημεία για τον εντοπισμό των καταβολικών ενζύμων ADAMTS5 & MMP-13 και του κολλαγόνου ΙΙ με την ποσοτικοποίηση στο G.

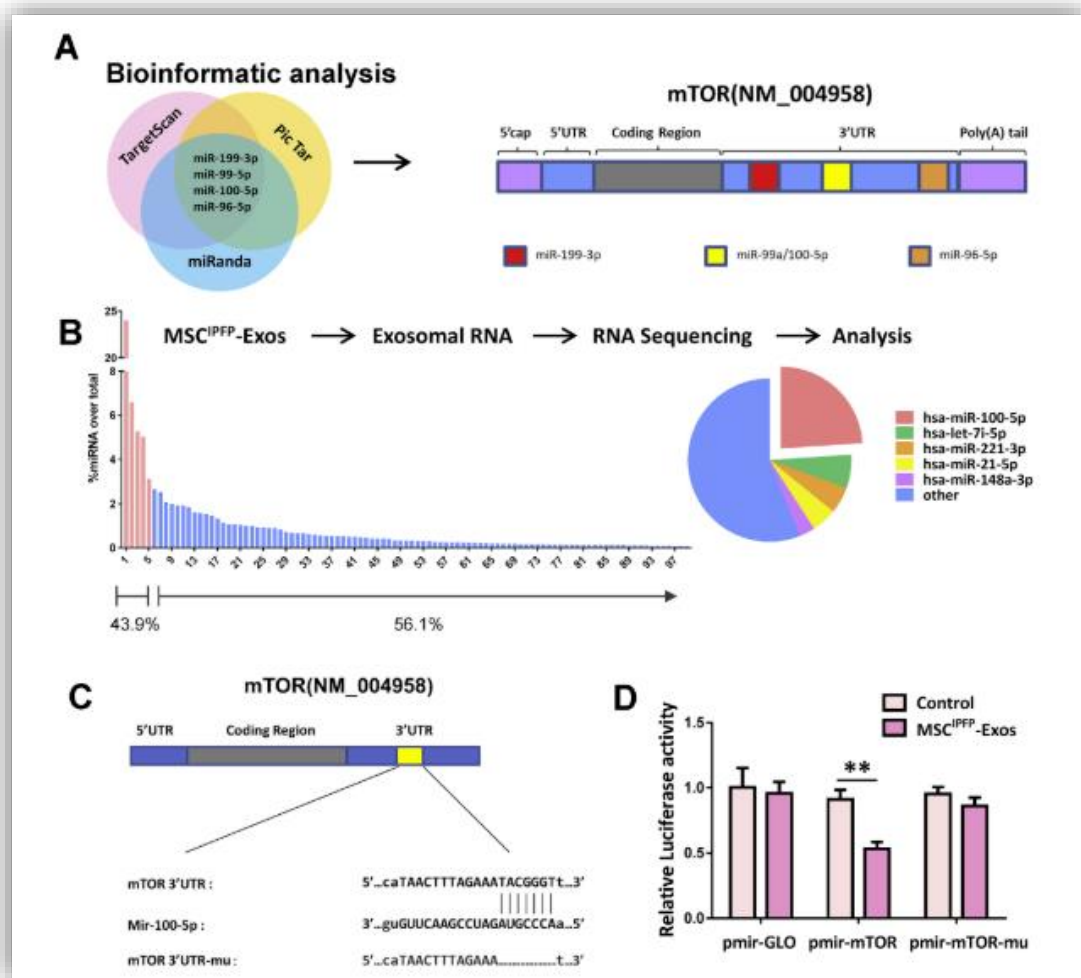
Παρατηρήθηκε ότι τα καταβολικά ένζυμα αυξάνονται με την επαγωγή της ΟΑ, αλλά υπό την επίδραση των ΕΣ μειώνονται. (Wu et al., 2019). Σε πειράματα που χορήγησαν τα ΕΣ σε ΟΑ χονδροκύτταρα, αναφέρθηκε μείωση της απόπτωσης παράλληλα με τους δείκτες καταβολισμού (ADAMTS5 και MMP-13) και αύξησης του αναβολισμού (κολλαγόνο ΙΙ). Ιδιαίτερα σημαντικό ήταν και το γεγονός ότι οι συγγραφείς ανέδειξαν και το μηχανισμό που λαμβάνει χώρα αναφέροντας ότι τα ΕΣ από τα IFPP-MSCs αυξάνουν τα επίπεδα αυτοφαγίας αναστέλλοντας το κρίσιμο κεντρικό μονοπάτι mTOR (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τα IFPP-MSC εξωσώματα αυξάνουν τα επίπεδα αυτοφαγίας μέσω παρεμπόδισης του μονοπατιού mTOR. (Wu et al., 2019).

A) Τα κοκκία LC3-GFP (δείκτης αυτοφαγίας) αυξάνουν στα χονδροκύτταρα που δέχονται τα εξωσώματα από τα MSC. B) Η στατιστική ανάλυση του αριθμού των LC3 κοκκίων. C) Ποσοτικοποίηση της έκκρισης MMP-13, η οποία μειώνεται υπό την επίδραση των ΕΣ και εξαρτάται από την αυτοφαγία (αναστολή της αυτοφαγίας με Bafilomycin A εκμηδενίζει την επίδραση των ΕΣ, 2 τελευταίες στήλες). D) Ανάλυση σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA για γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία. Με κόκκινο σημειώνεται η σημαντική μείωση της έκφρασης του mTOR στα χονδροκύτταρα που δέχθηκαν και ΕΣ από βλαστοκύτταρα. E) Η ποσοτικοποίηση της σχετικής μεταγραφικής έκφρασης του mTOR. F) Σε επίπεδο πρωτεΐνης, χαρακτηριστική εικόνα από western blot και η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση στο G.

Με βιοπληροφορική και χρήση 3 διαφορετικών προγραμμάτων εντόπισαν πιθανά miRNAs που είναι συμπληρωματικά για το 3' άκρο του mRNA του mTOR και διασταυρώσαν τα ευρήματα με τις αλληλουχίες από RNA-seq των περιεχομένων των ΕΣ (Wu et al., 2019). Αυτό ανέδειξε το miRNA 100-5p, το οποίο εν συνεχεία επιβεβαίωσαν με λειτουργικά πειράματα *in vitro* (Εικόνα 20).

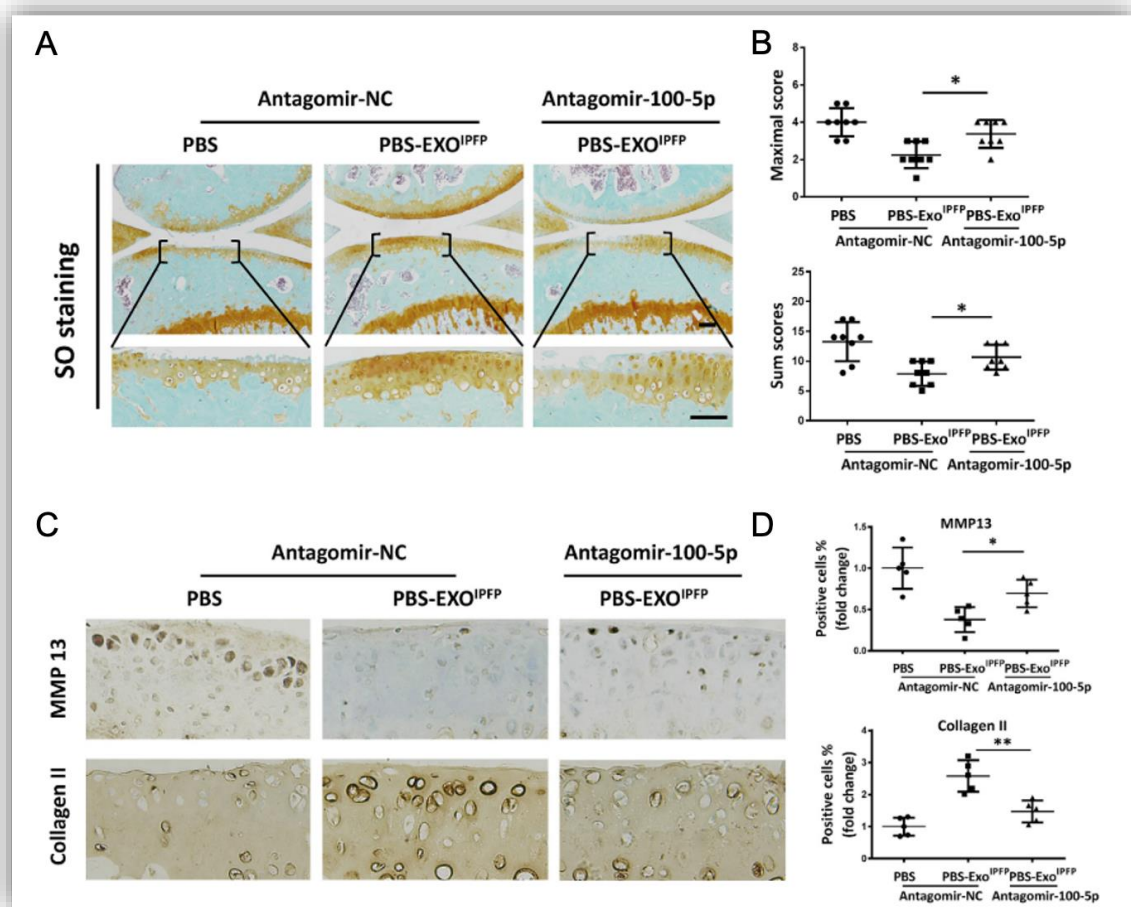


Εικόνα 20. Εξωσώματα εμπλουτισμένα σε miR-100-5p μειώνουν την έκφραση του mTOR. (Wu et al., 2019)

A) Τα 3 προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των σημείων στόχων για miRNAs στο mTOR. B) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs στα ΕΣ. Το miR-100-5p ξεχωρίζει ως το κυρίαρχο. C) Το σημείο πρόσδεσης του miR στο mTOR και σχεδιασμός του μεταλλαγμένου (-mu) που έχει απωλέσει την ικανότητα πρόσδεσης. D) Λειτουργικός χαρακτηρισμός με Luciferase assay, το miR-100-5p μειώνει την έκφραση του mTOR mRNA ενώ το μεταλλαγμένο όχι.

Στη συνέχεια οι Wu και συν., 2019 προέβησαν σε *in vivo* πειράματα όπου χορήγησαν σε ΟΑ ποντίκια (DMM model) τόσο ΕΣ από IFPP-MSC όσο και ανταγωνιστικό miRNA για το miR-100-5p. Στην ομάδα ελέγχου έκαναν κανονικά τη θεραπεία με ΕΣ μόνο, ή με PBS (mock). Παρατήρησαν ότι συνύπαρξη του antagomir miR-100-5p με τα ΕΣ, εκμηδενίζει την ευεργετική δράση των ΕΣ (Wu et al., 2019), εφόσον παρατηρήθηκε αφενός μείωση του αρθρικού χόνδρου και αφετέρου επαναφορά του καταβολικού ενζύμου MMP-13 σε υψηλά επίπεδα με ταυτόχρονη

μείωση του κολλαγόνου II, κάτι που επιβεβαίωσε πως το miR-100-5p που περικλείεται στα ΕΣ παίζει σημαντικό ρόλο στην πολύπλοκη διαδικασία ομοιοστάσης του χόνδρου (Εικόνα 21).

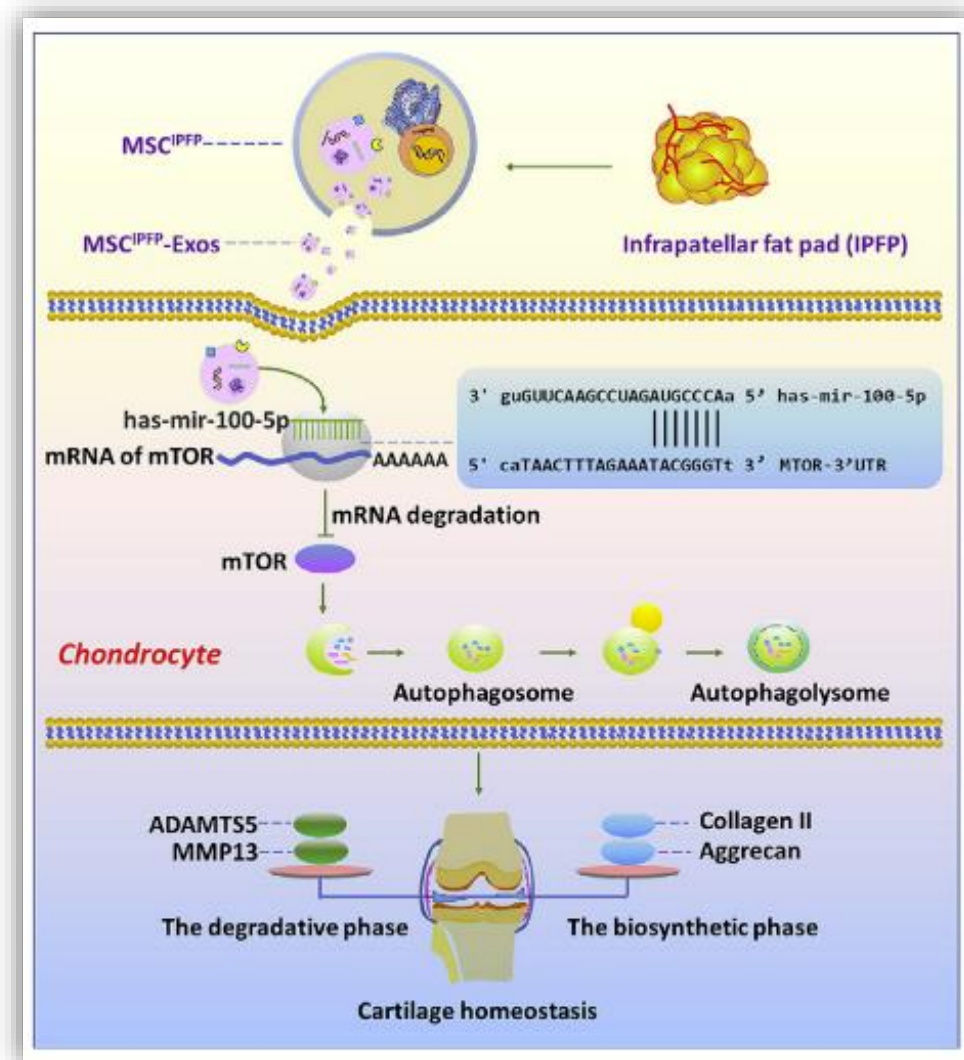


Εικόνα 21. Η ενδοαρθρική ένεση του antagomir-100-5p εκμηδενίζει το ευεργετικό αποτέλεσμα των IFPP-MSC εξωσωμάτων. (Wu et al., 2019)

A) Με Safranin-O χρώση βάφεται ο χόνδρος πορτοκαλί. Μετά τη χορήγηση ΕΣ φαίνεται η βελτίωση της εικόνας του αρθρικού χόνδρου σε σχέση με το κοντρόλ. Μετά τη χορήγηση antagomir για το miR-100-5p με τα ΕΣ παρατηρείται αναστολή της βελτίωσης του χόνδρου από τα ΕΣ. B) ποσοτικοποίηση και στατιστική απεικόνιση του A. C) Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των επιπέδων της MMP-13 και του κολλαγόνου II στην άρθρωση. Τα ΕΣ βοηθούν στη μείωση της MMP-13 και την αύξηση του κολλαγόνου II. Μετά τη χορήγηση και το antagomir του miR-100-5p, η ευεργετική αυτή δράση ακυρώνεται., D) Η στατιστική απεικόνιση του C.

Καταλήγοντας, οι Wu και συν., 2019 προτείνουν και ένα μοντέλο δράσης των εξωσωμάτων προερχόμενων από τα μεσεγχυματικά του λιπώδους ιστού της επιγονατίδας, τα οποία μέσω του miR-100-5p επιτυγχάνουν να αναστείλουν την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR, αυξάνοντας την αυτοφαγία στα χονδροκύτταρα, που έχει σαν επίπτωση τη βιοσυνθετική/αναβολική φάση με αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου II και αγκρεκάνης και τη

βελτίωση της αποικοδομητικής/καταβολικής φάσης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη MMP-13 και ADAMTS5 και η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό της OA (Εικόνα 22) (Wu et al., 2019).



Εικόνα 22. Το προτεινόμενο μοντέλο δράσης των εξωσωμάτων από IPFP-MSCs στην OA. (Wu et al., 2019).

4.5 Εξωσώματα από βλαστοκύτταρα είναι ευεργετικά, ενώ εξωσώματα από πάσχοντες ιστούς είναι επιβλαβή για την πορεία της OA – επιπλέον μελέτες

Πρόσφατη μελέτη των (Guo et al., 2021) έδειξε ότι εξωσώματα από OA χονδροκύτταρα περιέχουν και κυκλικά RNAs τα οποία μπορούν να τροφοδοτήσουν ένα φαύλο κύκλο φλεγμονής και αύξηση της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου. Συγκεκριμένα εστίασαν

στο circ-BRWD1 το οποίο έδειξαν πως δρα σαν σφουγγάρι (sponge) για το miR-1277 με συνέπεια να αυξάνεται η έκφραση του TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) γονιδίου στόχου του miR-1277 που συμμετέχει στην πρόκληση βλαβών στο χόνδρο τροφοδοτώντας το μονοπάτι της φλεγμονής (Guo et al., 2021).

Εξωσώματα από βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών φάνηκε να δρουν προστατευτικά για τα OA χονδροκύτταρα και στη μελέτη των (Wang et al., 2021) που έδειξε πως ένα long non-coding RNA, το lncRNA LYRM4-AS1, εμπεριέχεται στα εξωσώματα και εμπλέκεται σε έναν άξονα με το miR-6515-5p και το GRPR γονίδιο, έναν υποδοχέα G-protein που επηρεάζει τη ζωτικότητα των χονδροκυττάρων, με το miR-6515-5p να ρυθμίζει την έκφρασή του (Wang et al., 2021). Δίκτυα αλληλεπιδράσεων με lncRNA, miRNAs και πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από εξωσώματα βλαστοκυττάρων βρέθηκαν και στην έρευνα των (Liu et al., 2018), όπου παρατηρήθηκε η ίδια επίδραση που αναφέρθηκε και στις προηγούμενες ενότητες, δηλαδή επαναφορά της ομοιόστασης στο χόνδρο με μείωση της MMP-13 και αύξηση του κολλαγόνου τύπου II και της αγκρεκάνης, και μια αντιστροφή του IL-1β-επαγόμενου OA φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, δείχθηκε πως το lncRNA-KLF3-AS1 που περιέχεται σε ΕΣ από μεσεγχυματικά, λειτουργεί σαν σπόγγος-παγίδα για το miR-206 θέτοντας το εκτός διαθεσιμότητας, με αποτέλεσμα να μπορεί το γονίδιο *GIT1* (G-protein coupled receptor kinase interacting protein 1) να εκφράζεται απρόσκοπτα. Το *GIT1* με τη σειρά του, συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων και την παρεμπόδιση της απόπτωσής τους, κάτι ευκαίω για την ανάπλαση της βλάβης στην εκφυλιστική αρθρίτιδα (Liu et al., 2018). Οι συγγραφείς προτείνουν πως το lncRNA-KL3-AS1 θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικό θεραπευτικό στόχο της OA (Liu et al., 2018).

Την αντίθετη επίδραση στα χονδροκύτταρα έχουν εξωσώματα από ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων που τροφοδοτούν ιστούς της άρθρωσης, όπως έδειξε πρόσφατη μελέτη των (Yang et al., 2021). Οι ερευνητές έδειξαν πως τα ΕΣ από τα ενδοθηλιακά κύτταρα διευκόλυναν την εγκατάσταση της OA με το να προωθούν την απόπτωση των χονδροκυττάρων (Yang et al., 2021). Ως μηχανισμός προτάθηκε η παρεμπόδιση της απόπτωσης και της έκφρασης του p21 με μείωση της ικανότητας των χονδροκυττάρων να αντισταθούν στο οξειδωτικό στρες και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), γεγονός που οδηγεί σε αύξηση των ROS ενδοκυτταρικά και σε απόπτωση (Yang et al., 2021). Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ήταν η αρνητική επίδραση των ΕΣ που προέρχονται από ενδοθηλιακά κύτταρα της πάσχουσας άρθρωσης, η οποία δείχθηκε να λαμβάνει χώρα και *in vivo* στο DMM μοντέλο της OA. Αυτό οδήγησε τους συγγραφείς να

προτείνουν ως πιθανή μελλοντική θεραπευτική στρατηγική την παρεμπόδιση έκκρισης ΕΣ από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. (Yang et al., 2021).

Τέλος, ενισχύοντας την άποψη ότι τα ΕΣ από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι ευεργετικά, οι (Zhao et al., 2020a) έδειξαν ότι ΕΣ από μεσεγχυματικά που προέρχονται από λίπος (Adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs) προωθούν τη χονδρογένεση και καταπραΰνουν τη φλεγμονή επάγοντας την έκφραση 2 microRNAs, του miR-145 και miR-221 (Zhao et al., 2020a). Συγκεκριμένα, μετά από χορήγηση ΕΣ από ADSCs παρατήρησαν μειωμένη έκφραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων όπως IL-6, TNF α , NF- κ B και αύξηση της αντιφλεγμονώδους IL-10. Σημαντικό εύρημα ήταν ότι αυτή η επίδραση δείχθηκε να είναι δοσοεξαρτώμενη (Zhao et al., 2020a). Επιπλέον, παρατήρησαν και αυξημένη χονδρογένεση, μέσω χρώσης με Alcian Blue που βάφει τον χόνδρο αλλά και μέσω της αυξημένης έκφρασης σε επίπεδο mRNA των δεικτών χονδρογένεσης όπως Sox9, κολλαγόνο II και β -κατενίνη. Η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των χονδρογενετικών δεικτών αποδόθηκε στα miR-145 και miR-221, τα οποία εμπεριέχονται στα εξωσώματα από τα ADSCs και εμποδίζουν τη ρύθμιση των παραπάνω τριών γονιδίων (Zhao et al., 2020a).

5. Συμπεράσματα

5.1 Ο διττός ρόλος των ΕΣ στην ΟΑ

Τα εξωσώματα έχουν διαφορετική επίδραση ανάλογα από την προέλευσή τους, τον κυτταρικό τύπο δηλαδή που τα παράγει. Εξωσώματα προερχόμενα από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα φαίνεται πως ασκούν προστατευτική δράση και βοηθούν στην αναχαίτιση της φλεγμονής, ενώ αντιθέτως εξωσώματα από ΟΑ χονδροκύτταρα ή από M1 πολωμένα μακροφάγα επάγουν τη φλεγμονή. (Hassanzadeh et al., 2021; Kim et al., 2021; Yin et al., 2019). Τα εξωσώματα παίζουν κεντρικό ρόλο στα δίκτυα επικοινωνίας των κυττάρων, μια επικοινωνία που έρχεται ολοένα και περισσότερο στο επίκεντρο της έρευνας ως σημαντική για την κατανόηση των βιολογικών δικτύων και της ομοιόστασης των ιστών. Λόγω της σημαντικής επιρροής που έχουν στα δίκτυα επικοινωνίας των κυττάρων, τα εξωσώματα έχουν μεταφερθεί και στο κέντρο της προσοχής του πεδίου της εφαρμοσμένης βιοτεχνολογίας, όπου διερευνάται η πιθανή χρήση τους ως θεραπευτικοί ή και διαγνωστικοί στόχοι (Fuloria et al., 2021; Ju et al., 2019; Ryan et al., 2021; Schulze-Tanzil, 2021; Suh et al., 2021; Tofiño-Vian et al., 2018; Wu et al., 2020).

Είναι γεγονός πως τα εξωσώματα απαντώνται σε όλα τα βιολογικά υγρά και αυτό τα κάνει ισχυρούς υποψηφίους για βιοδείκτες, καθώς μπορούν να απομονωθούν σχετικά εύκολα και σε επαρκείς ποσότητες με ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους. Σε αυτό συνεπικουρεί και η διαπίστωση πως τα περιεχόμενά τους αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του κυττάρου που τα παράγει. Στην ΟΑ όσο εξελίσσεται η νόσος, τόσο τα ΕΣ από χονδροκύτταρα αυξάνουν σε αριθμό και εμπλουτίζονται με βιομόρια που προάγουν τη φλεγμονή. Τα διαφορικά επίπεδα των miRNA, lncRNA ή των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα ΕΣ θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλείο διάγνωσης για την ΟΑ και άλλες ασθένειες. Απαιτούνται όμως καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες για να δειχθεί αν μπορούν να εφαρμοστούν στη κλινική πράξη, διότι υπάρχουν ακόμα μεγάλες προκλήσεις, όπως ότι αν και τα βιολογικά υγρά είναι εύκολα προσβάσιμα, βρίθουν παραγόντων, και επομένως δεν είναι εύκολο να καθαριστούν τα εξωσώματα από παράγοντες που προέρχονται από άλλες πηγές, και αυτό καθιστά τη διεξαγωγή συμπερασμάτων εξαιρετικά δύσκολη (D'Agneili et al., 2020; Maehara et al., 2021; Mihanfar et al., 2020).

Ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και σηματοδοτικών μονοπατιών ρυθμίζεται και τροποποιείται υπό την επίδραση των εξωσωμάτων. Και αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς τα ΕΣ

αποδεδειγμένα φέρουν πληθώρα miRNAs, lncRNAs και μόρια πρόσδεσης σε υποδοχείς, τα οποία λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες ή μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων-δεκτών. Μεταξύ των κυρίων σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζονται από τα ΕΣ είναι η αυτοφαγία, το mTOR, η φλεγμονή, η απόπτωση, η σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας, η προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού, η κινητικότητα/μεταναστευτικότητα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η γήρανση και διάφορα μονοπάτια μεταβολισμού.

5.2 Προσεγγίσεις για κλινική θεραπευτική χρήση εξωσωμάτων στην ΟΑ.

Τον Αύγουστο του 2021 καταγράφονταν στη βάση δεδομένων *clinicaltrials.gov* 226 κλινικές έρευνες φάσης I ή II με τη λέξη κλειδί «exosomes», καταδεικνύοντας το αυξημένο ενδιαφέρον που υπάρχει με βάση τις προ-κλινικές μελέτες για τη θεραπευτική αξία των εξωσωμάτων για μεγάλο εύρος ασθενειών, όπως καρκίνο ή εκφυλιστικές νόσους (Fuloria et al., 2021; Ragni et al., 2020; Ryan et al., 2021). Για την ΟΑ είναι σε εξέλιξη 2 κλινικές μελέτες φάσης I σύμφωνα με το *clinicaltrial.gov*. Μέρος του ενθουσιασμού που υπάρχει για τα εξωσώματα αποδίδεται στο ότι αυτά θεωρούνται πως μπορούν να αντικαταστήσουν τα βλαστοκύτταρα και να επιφέρουν τα ίδια ευεργετικά αποτελέσματα χωρίς τα μειονεκτήματα των κυτταρικών θεραπειών (Behera and Tyagi, 2018). Τα ΕΣ φέρουν μερικά πλεονεκτήματα λόγω των λιγότερων ενδοιασμών σχετικά με την ασφάλεια και τη μειωμένη τοξικότητα και ανοσογονικότητα συγκριτικά με τα βλαστοκύτταρα. Επίσης τα ΕΣ δεν εκφράζουν MHC I/II και γι' αυτό το λόγο δεν σχετίζονται με απόρριψη, ακόμα και αν δεν είναι αυτόλογης προέλευσης, ενώ τα ετερόλογα βλαστοκύτταρα χρειάζονται χορήγηση ανοσοκατασταλτικών. Επίσης, σε σύγκριση με τα ζωντανά κύτταρα, τα εξωσώματα είναι πιο σταθερά όσον αφορά στη φύλαξη τους μέχρι τη χορήγηση και δεν έχουν κίνδυνο εμφάνισης ανευπλοειδιών μετά από *in vivo* χορήγηση (Behera and Tyagi, 2018). Παρά τις ετερογένειες στα περιεχόμενα των ΕΣ από τις διάφορες πηγές βλαστοκυττάρων, οι περισσότερες προ-κλινικές έρευνες σε ζώα έχουν δείξει πως έχουν ευεργετική δράση στην ΟΑ (Kim et al., 2021). Υπάρχουν επομένως ελπιδοφόρες προοπτικές για τη χρήση των ΕΣ ως cell-free προϊόν βιοτεχνολογίας που μπορεί να παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες (scalability) ξεπερνώντας τους περιορισμούς που υπάρχουν σήμερα με τις εφαρμογές αυτόλογων κυτταρικών θεραπειών που προσαρμόζονται για έναν μοναδικό ασθενή. Επομένως η κλινική τους χρησιμότητα θα πρέπει να αποδειχθεί μετά από θετικά αποτελέσματα μελλοντικών κλινικών δοκιμών μετά από ενδοαρθρική χορήγηση εξωσωμάτων από βλαστοκύτταρα σε άτομα με ΟΑ διαφόρων σταδίων και παρακολούθηση της κλινικής τους πορείας.

5.3 Προσπάθειες βελτιστοποίησης, προκλήσεις και προοπτικές.

Η έρευνα πάνω στην κλινική χρησιμότητα των εξωσωμάτων για την αντιμετώπιση της ΟΑ και άλλων παθήσεων δεν περιορίζεται μόνο στην απομόνωσή τους και αξιοποίησή τους από πηγές μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Για την προσπάθεια αυτή επιστρατεύονται και μέσα νανοτεχνολογίας, βιοτεχνολογίας και προηγμένων υλικών για τη βελτιστοποίηση και τροποποίηση των ΕΣ προς το καλύτερο. Τα ΕΣ προσφέρονται ως μέσο προσρόφησης θεραπευτικών ουσιών, πρωτεϊνών στόχευσης ή νανοσωματιδίων με θεραπευτικό φορτίο ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά τους. Επίσης παρεμβάσεις στα ίδια τα κύτταρα που τα παράγουν *in vitro* σε βιοαντιδραστήρες θα μπορούσαν να αλλάξουν το περιεχόμενό τους με προγραμματισμένο τρόπο, ενώ εξελιγμένα βιοσυμβατά 3D υλικά μπορούν να βελτιώσουν την συγκράτηση των ΕΣ στο σημείο που χρειάζονται να δράσουν. Το πεδίο των συνθετικών εξωσωμάτων είναι επίσης ταχέως εξελισσόμενο (Kim et al., 2021; Ni et al., 2020; Zhou et al., 2020a). Προκλήσεις για την κλινική τους χρήση είναι η το υψηλό κόστος για τη παραγωγή τους, η επαναληψιμότητα, καθώς και η δυνατότητα να καθαριστούν από προσμίξεις πολύπλοκων μέσων στα οποία βρίσκονται. Τέλος, είναι αναγκαία η διενέργεια σωστά σχεδιασμένων κλινικών μελετών σε ΟΑ ασθενείς προκειμένου να αναδειχθεί η ικανότητα των ΕΣ από βλαστοκύτταρα να αναστείλουν ή και να αναστρέψουν την πορεία της νόσου, όπως συμβαίνει στα ζωικά μοντέλα. Μόνο τότε θα μπορούσαν τα ΕΣ να αποδειχθούν ως μία εναλλακτική για τις κοστοβόρες και πολύπλοκες -όσον αφορά τις ρυθμιστικές διαδικασίες αδειοδότησης- κυτταρικές θεραπείες με αυτόλογα βλαστοκύτταρα, όχι μόνο για την οστεοαρθρίτιδα αλλά και για άλλες παθήσεις.

6. Βιβλιογραφία

- Alcaraz, M.J., Compañ, A., and Guillén, M.I. (2019). Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells as Novel Treatments for Musculoskeletal Diseases. *Cells* 9.
- Asghar, S., Litherland, G.J., Lockhart, J.C., Goodyear, C.S., and Crilly, A. (2020). Exosomes in intercellular communication and implications for osteoarthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* 59, 57–68.
- Aubourg, G., Rice, S.J., Bruce-Wootton, P., and Loughlin, J. (2021). Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.*
- De Bari, C., and Roelofs, A.J. (2018). Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 40, 74–80.
- De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928–1942.
- Behera, J., and Tyagi, N. (2018). Exosomes: mediators of bone diseases, protection, and therapeutics potential. *Oncoscience* 5, 181–195.
- Biazzo, A., D’Ambrosi, R., Masia, F., Izzo, V., and Verde, F. (2020). Autologous adipose stem cell therapy for knee osteoarthritis: where are we now? *Phys. Sportsmed.* 48, 392–399.
- van den Bosch, M.H.J. (2021). Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthr. Cartil.* 29, 143–150.
- Bousnaki, M., Bakopoulou, A., Kritis, A., and Koidis, P. (2020). The Efficacy of Stem Cells Secretome Application in Osteoarthritis: A Systematic Review of In Vivo Studies. *Stem Cell Rev. Reports* 16, 1222–1241.
- Chang, Y.-H., Wu, K.-C., Harn, H.-J., Lin, S.-Z., and Ding, D.-C. Exosomes and Stem Cells in Degenerative Disease Diagnosis and Therapy.
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J.L., and Im, H.J. (2017). Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* 5.
- Cheng, L., Zhang, K., Wu, S., Cui, M., and Xu, T. (2017). Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: Opportunities and challenges in cell-free therapy. *Stem Cells Int.* 2017.
- Chow, Y.Y., and Chin, K.Y. (2020). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2020.
- D’Agnelli, S., Gerra, M.C., Bignami, E., and Arendt-Nielsen, L. (2020). Exosomes as a new pain biomarker opportunity. *Mol. Pain* 16.
- D’Arrigo, D., Roffi, A., Cucchiari, M., Moretti, M., Candrian, C., and Filardo, G. (2019). Secretome

and Extracellular Vesicles as New Biological Therapies for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 8, 1867.

Ding, W., Xu, Y.Q., Zhang, Y., Li, A.X., Qiu, X., Wen, H.J., and Tan, H.B. (2020). Efficacy and Safety of Intra-Articular Cell-Based Therapy for Osteoarthritis: Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Cartilage*.

Esmaeili, A., Hosseini, S., and Baghaban Eslaminejad, M. (2021). Engineered-extracellular vesicles as an optimistic tool for microRNA delivery for osteoarthritis treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 79–91.

Fuloria, S., Subramanian, V., Dahiya, R., Dahiya, S., Sudhakar, K., Kumari, U., Sathasivam, K., Meenakshi, D.U., Wu, Y.S., Sekar, M., et al. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Regenerative Potential and Challenges. *Biology (Basel)*. 10, 172.

Guo, Z., Wang, H., Zhao, F., Liu, M., Wang, F., Kang, M., He, W., and Lv, Z. (2021). Exosomal circ-BRWD1 contributes to osteoarthritis development through the modulation of miR-1277/TRAF6 axis. *Arthritis Res. Ther.* 23, 1–14.

Harrell, C.R., Markovic, B.S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., and Volarevic, V. (2019). Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 109, 2318–2326.

Hassanzadeh, A., Rahman, H.S., Markov, A., Endjun, J.J., Zekiy, A.O., Chartrand, M.S., Beheshtkhoo, N., Kouhbanani, M.A.J., Marofi, F., Nikoo, M., et al. (2021). Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem Cell Res. Ther.* 12.

He, L., He, T., Xing, J., Zhou, Q., Fan, L., Liu, C., Chen, Y., Wu, D., Tian, Z., Liu, B., et al. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 1–15.

Hong, Z., Chen, J., Zhang, S., Zhao, C., Bi, M., Chen, X., and Bi, Q. (2019). Intra-articular injection of autologous adipose-derived stromal vascular fractions for knee osteoarthritis: a double-blind randomized self-controlled trial. *Int. Orthop.* 43, 1123–1134.

Huang, R., Li, W., Zhao, Y., Yang, F., and Xu, M. (2020). Clinical efficacy and safety of stem cell therapy for knee osteoarthritis: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 99, e19434.

Hunter, D.J., Schofield, D., and Callander, E. (2014). The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014 107 10, 437–441.

Hwang, J.J., Rim, Y.A., Nam, Y., and Ju, J.H. (2021). Recent Developments in Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Front. Immunol.* 12.

- Im, G.I. (2021). Current status of regenerative medicine in osteoarthritis. *Bone Jt. Res.* *10*, 134–136.
- Jang, S., Lee, K., and Ju, J.H. (2021). Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 1–15.
- Jeyaraman, M., Muthu, S., Gulati, A., Jeyaraman, N., G.S, P., and Jain, R. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Therapeutic Avenue in Knee Osteoarthritis. *Cartilage*.
- Ji, Q., Zheng, Y., Zhang, G., Hu, Y., Fan, X., Hou, Y., Wen, L., Li, L., Xu, Y., Wang, Y., et al. (2019). Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *78*, 100–110.
- Jiang, S., Tian, G., Li, X., Yang, Z., Wang, F., Tian, Z., Huang, B., Wei, F., Zha, K., Sun, Z., et al. (2021). Research Progress on Stem Cell Therapies for Articular Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int.* *2021*, 8882505.
- Ju, C., Liu, R., Zhang, Y., Zhang, F., Sun, J., Lv, X. Bin, and Zhang, Z. (2019). Exosomes May Be the Potential New Direction of Research in Osteoarthritis Management. *Biomed Res. Int.* *2019*.
- Kalamegam, G., Memic, A., Budd, E., Abbas, M., and Mobasheri, A. (2018). A comprehensive review of stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Springer New York LLC), pp. 23–36.
- Kim, C., and Keating, A. (2019). Cell therapy for knee osteoarthritis: Mesenchymal stromal cells. *Gerontology* *65*, 294–298.
- Kim, G.B., Shon, O.J., Seo, M.S., Choi, Y., Park, W.T., and Lee, G.W. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes and their therapeutic potential for osteoarthritis. *Biology (Basel)*. *10*.
- Kong, L., Zheng, L.Z., Qin, L., and Ho, K.K.W. (2017). Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J. Orthop. Transl.* *9*, 89–103.
- Li, Z.Z., Wang, Y., Xiao, K., Xiang, S., Li, Z.Z., and Weng, X. (2018). Emerging role of exosomes in the joint diseases. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 2008–2017.
- Liu, Y., Lin, L., Zou, R., Wen, C., Wang, Z., and Lin, F. (2018). MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle* *17*, 2411–2422.
- De Luna, A., Otahal, A., and Nehrer, S. (2020). Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles – Silver Linings for Cartilage Regeneration? *Front. Cell Dev. Biol.* *8*.
- Maehara, M., Toyoda, E., Takahashi, T., Watanabe, M., and Sato, M. (2021). Potential of exosomes for diagnosis and treatment of joint disease: Towards a point-of-care therapy for osteoarthritis of the knee. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 1–16.

- Mancuso, P., Raman, S., Glynn, A., Barry, F., Murphy, J.M., P, M., S, R., A, G., F, B., and JM, M. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Osteoarthritis: The Critical Role of the Cell Secretome. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *7*.
- Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S., Zekiy, A.O., Jarahian, M., Chartrand, M.S., Pathak, Y., Marofi, F., Shamlou, S., and Hassanzadeh, A. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Res. Ther.* *12*.
- Mianehsaz, E., Mirzaei, H.H.R., Mahjoubin-Tehran, M., Rezaee, A., Sahebnasagh, R., Pourhanifeh, M.H., Mirzaei, H.H.R., and Hamblin, M.R. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A new therapeutic approach to osteoarthritis? *Stem Cell Res. Ther.* *10*, 1–13.
- Mihanfar, A., Shakouri, S.K., Khadem-Ansari, M.H., Fattahi, A., Latifi, Z., Nejabati, H.R., and Nouri, M. (2020). Exosomal miRNAs in osteoarthritis. *Mol. Biol. Rep.* *47*, 4737–4748.
- Moghadasi, S., Elveny, M., Rahman, H.S., Suksatan, W., Jalil, A.T., Abdelbasset, W.K., Yumashev, A.V., Shariatzadeh, S., Motavalli, R., Behzad, F., et al. (2021). A paradigm shift in cell-free approach: the emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. *J. Transl. Med.* *19*, 302.
- Ng, J., Little, C.B., Woods, S., Whittle, S., Lee, F.Y., Gronthos, S., Mukherjee, S., Hunter, D.J., and Worthley, D.L. (2020). Stem cell-directed therapies for osteoarthritis: The promise and the practice. *Stem Cells* *38*, 477–486.
- Ni, Z., Kuang, L., Chen, H., Xie, Y., Zhang, B., Ouyang, J., Wu, J., Zhou, S., Chen, L.L., Su, N., et al. (2019). The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocyte enhanced mature IL-1 β production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis. *Cell Death Dis.* *10*.
- Ni, Z., Zhou, S., Li, S., Kuang, L., Chen, H., Luo, X., Ouyang, J., He, M., Du, X., and Chen, L. (2020). Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Res.* *8*.
- Di Nicola, V. (2020). Degenerative osteoarthritis a reversible chronic disease. *Regen. Ther.* *15*, 149–160.
- Ragni, E., Perucca Orfei, C., De Luca, P., Mondadori, C., Viganò, M., Colombini, A., and De Girolamo, L. (2020). Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: The example of joint disease. *Stem Cell Res. Ther.* *11*.
- Richards, M.M., Maxwell, J.S., Weng, L., Angelos, M.G., and Golzarian, J. (2016). Intra-articular Treatment of Knee Osteoarthritis: from Anti-inflammatories to Products of Regenerative Medicine. *Phys. Sportsmed.* *44*, 101.
- Ryan, S.T., Hosseini-Beheshti, E., Afrose, D., Ding, X., Xia, B., Grau, G.E., Little, C.B., McClements, L., and Li, J.J. (2021). Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of

Inflammation-Related Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–34.

Schulze-Tanzil, G. (2021). Experimental therapeutics for the treatment of osteoarthritis. *J. Exp. Pharmacol.* 13, 101–125.

Somoza, R.A., Welter, J.F., Correa, D., and Caplan, A.I. (2014). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng. - Part B Rev.* 20, 596–608.

Suh, J.H., Joo, H.S., Hong, E.B., Lee, H.J., and Lee, J.M. (2021). Therapeutic application of exosomes in inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–22.

Tofiño-Vian, M., Guillén, M.I., Pérez Del Caz, M.D., Silvestre, A., and Alcaraz, M.J. (2018). Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 11–25.

Tsezou, A. (2014). Osteoarthritis year in review 2014: Genetics and genomics. *Osteoarthr. Cartil.* 22, 2017–2024.

Wang, X., Li, Z., Cui, Y., Cui, X., Chen, C., and Wang, Z. (2021). Exosomes Isolated From Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exert a Protective Effect on Osteoarthritis via lncRNA LYRM4-AS1-GRPR-miR-6515-5p. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–15.

Wu, J., Kuang, L., Chen, C., Yang, J., Zeng, W.N., Li, T., Chen, H., Huang, S., Fu, Z., Li, J., et al. (2019). miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials* 206, 87–100.

Wu, X., Wang, Y., Xiao, Y., Crawford, R., Mao, X., and Prasad, I. (2020). Extracellular vesicles: Potential role in osteoarthritis regenerative medicine. *J. Orthop. Transl.* 21, 73–80.

Xie, F., Liu, Y. li, Chen, X. yuan, Li, Q., Zhong, J., Dai, B. yu, Shao, X. fang, and Wu, G. bao (2020). Role of MicroRNA, LncRNA, and Exosomes in the Progression of Osteoarthritis: A Review of Recent Literature. *Orthop. Surg.* 12, 708–716.

Yadav, P., Vats, R., Bano, A., and Bhardwaj, R. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation and regeneration therapeutics as an ameliorative approach for COVID-19 pandemics. *Life Sci.* 263.

Yang, R.Z., Zheng, H.L., Xu, W.N., Zheng, X.F., Li, B., Jiang, L.S., and Jiang, S.D. (2021). Vascular endothelial cell-secreted exosomes facilitate osteoarthritis pathogenesis by promoting chondrocyte apoptosis. *Aging (Albany. NY).* 13, 4647–4662.

Yin, K., Wang, S., and Zhao, R.C. (2019). Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: A new therapeutic paradigm. *Biomark. Res.* 7.

Zhang, H., Cai, D., and Bai, X. (2020). Macrophages regulate the progression of osteoarthritis.

Osteoarthr. Cartil. 28, 555–561.

Zhang, X., He, J., and Wang, W. (2021). Progress in the use of mesenchymal stromal cells for osteoarthritis treatment. *Cytotherapy* 000.

Zhao, C., Chen, J.Y., Peng, W.M., Yuan, B., Bi, Q., and Xu, Y.J. (2020a). Exosomes from adipose-derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR-145 and miR-221. *Mol. Med. Rep.* 21, 1881–1889.

Zhao, X., Zhao, Y., Sun, X., Xing, Y., Wang, X., and Yang, Q. (2020b). Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–14.

Zhou, Q., Cai, Y., Jiang, Y., and Lin, X. (2020a). Exosomes in osteoarthritis and cartilage injury: Advanced development and potential therapeutic strategies. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1811–1820.

Zhou, Q. fa, Cai, Y. zhi, and Lin, X. jin (2020b). The dual character of exosomes in osteoarthritis: Antagonists and therapeutic agents. *Acta Biomater.* 105, 15–25.