



Τα εξωσώματα ως Βιοδείκτες και Θεραπευτικά Οχήματα Μεταφοράς Φαρμάκων διαμέσου των Βιολογικών Μεμβρανών για Διάφορες Ασθένειες του Ανθρώπου

Φανή-Νίκη Βάρρα ^{1,2}, Βικτώρια-Κωνσταντίνα Βάρρα ³, Μιχαήλ Βάρρας ^{4*}

¹Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 68100 Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα

²Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Frederick, Λευκωσία 1036, Κύπρος

³Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26504, Ελλάδα

⁴Τέταρτο Μαιευτικό-Γυναικολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Μαιευτήριο «Ελενα Βενιζέλου», Πλατείας Έλενα Βενιζέλου 2, Αμπελόκηποι, 11521 Αθήνα, Ελλάδα

 DOI: 10.60988/p.v37i1.76

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

**Εξωκυτταρικά
Κυστίδια; Εξωσώματα;
Βιολογικές Λειτουργίες;
Νανομεταφορείς; Οχήματα
Μεταφοράς Φαρμάκων**

ARTICLE INFO:

Received: October 19, 2024

Revised: November 20, 2024

Accepted: December 11, 2024

Available on line: April 14, 2025

* CORRESPONDING

AUTHOR:

Δρ. Μιχαήλ Βάρρας,
Email: mnvarras@otenet.gr
Tel: +2106402000

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εξωσώματα είναι νανοκυστίδια αποτελούμενα από μεμβράνες διπλής στοιβάδας που εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές βιολογικές διεργασίες και μπορούν να διαπεράσουν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η χρήση των εξωσωμάτων ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλα συστήματα χορήγησης νανοσωματιδίων, όπως είναι τα λιποσώματα και τα πολυμερή νανοσωματίδια. Τα πλεονεκτήματα των εξωσωμάτων έναντι των λιποσωμάτων και των πολυμερών στην μεταφορά φαρμάκων οφείλονται α) στο μικρό μέγεθος των εξωσωμάτων, β) στη μεγάλη ικανότητα των εξωσωμάτων να προκαλούν σύντηξη της πλασματικής μεμβράνης διαφόρων τύπων κυττάρων και να διοχετεύουν το περιεχόμενό τους εντός αυτών, γ) στο μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής των μεταφερόμενων φαρμάκων, δ) στη μεγάλη τάση των μεταφερόμενων φαρμάκων να συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή, ε) στη μεγάλη ειδικότητα των μεταφερόμενων φαρμάκων με τα εξωσώματα στα κύτταρα-στόχους, στ) στη βιοσυμβατότητα των εξωσωμάτων που μεταφέρουν

φάρμακα χωρίς πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης, ζ) στη μεγάλη βιοαποδομησιμότητα των εξωσωματίων, η) στη μικρή τοξικότητα των εξωσωμάτων, (θ) στη μη συσσώρευση των εξωσωμάτων στο ήπαρ και την αποφυγή του μεταβολισμού πρώτης διόδου. Στο παρόν άρθρο περιγράφονται αναλυτικά η προέλευση, το φορτίο και τα χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων, ο ρόλος τους ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες και η κλινική σημασία τους ως θεραπευτικά οχήματα μεταφοράς 1) μικρών μορίων, 2) μεγάλων μορίων όπως πρωτεϊνών και πεπτιδίων, 3) μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNA) και 4) microRNA (miRNA) για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου. Συμπερασματικά, θα πρέπει να γίνουν πλήρως κατανοητά τα διάφορα συστατικά των εξωσωμάτων, οι λειτουργικές ιδιότητές τους και ο ρόλος τους ως βιοδείκτες προτού αυτά τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων αποτελέσουν τη νέα θεραπευτική πραγματικότητα.

1. Εισαγωγή

Τα εξωκυτταρικά ή εξωκυττάρια κυστίδια (extracellular vesicles, EVs) περιλαμβάνουν ετερογενή κυστίδια δεσμευμένα σε λιπίδια, τα οποία προέρχονται από τα περισσότερα κύτταρα του οργανισμού, εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο και συμβάλλουν στην επικοινωνία των κυττάρων μεταφέροντας βιολογικά σήματα όπως μη κωδικοποιητικά RNA, κωδικοποιητικά RNA, κλώνους DNA και λιπίδια.¹⁻⁵ Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) μπορούν επίσης να μεταφέρουν το φορτίο/μηνύματά τους στα κύτταρα-στόχους από πολλά σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένων του κυκλοφορικού συστήματος, του σάλιου, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), των ούρων, του γάλακτος και του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF).⁶ Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, του πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης, της αγγειογένεσης, της παρουσίας του αντιγόνου, της φλεγμονής, της πήξης, της μετάστασης, του επαναπρογραμματισμού, της αναδιαμόρφωσης, της απόπτωσης και της κυτταρικής ομοιοστάσης.⁷⁻¹³ Ανάλογα με την προέλευση των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) και την κατάσταση των κυττάρων-στόχων, τα εξωκυτταρικά κυστίδια

(Evs) μόλις δράσουν στα κύτταρα-στόχους μπορούν να οδηγήσουν είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις.¹⁴ Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τον μηχανισμό βιογένεσής τους, έχουν ταξινομηθεί σε τρεις κύριες υποκατηγορίες ως εξωσώματα ή νανοσώματα (30-150 nm), τα μικροκυστίδια (MVs) ή εκτοσώματα (100-1000 nm) και τα αποπτωτικά σωματίδια (>1000 nm).¹⁵⁻²⁰ Το φορτίο (cargo) των εξωσωμάτων προέρχονται από τον πυρήνα, την συσκευή του Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα.¹⁷ Ο πίνακας 1 παρουσιάζει συνοπτικά τα χαρακτηριστικά των εξωκυτταρικών κυστιδίων.²¹⁻²⁴

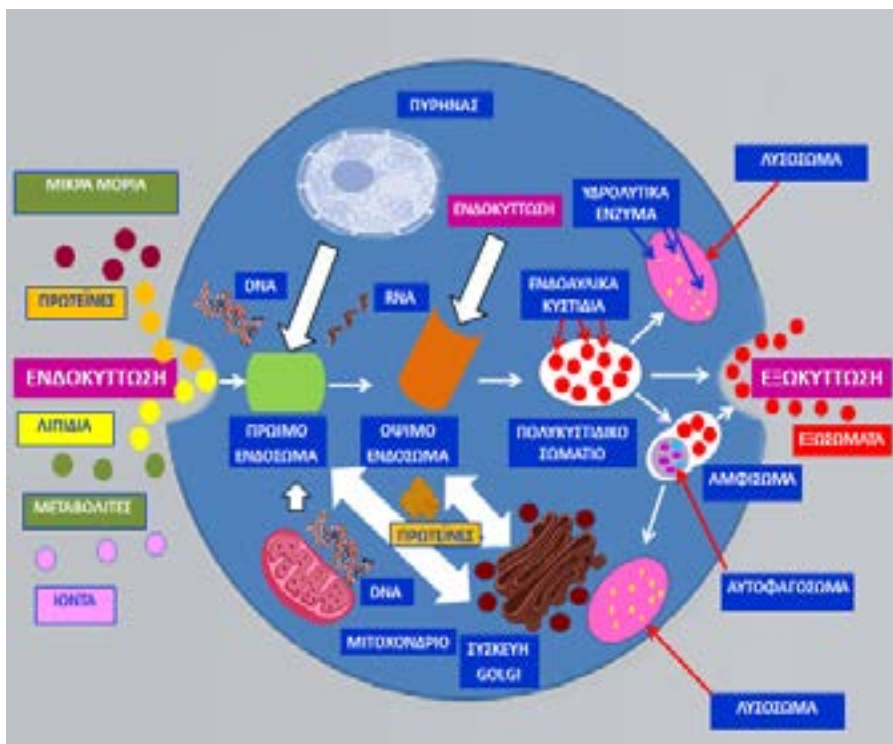
Ο σχηματισμός των εξωσωμάτων γίνεται με την διαδικασία της διπλής προς τα μέσα ενδοκύττωσης.¹⁷ Η πρώτη ενδοκύττωση συμβαίνει όταν η κυτταροπλασματική μεμβράνη ενός κυττάρου εγκλωπώνεται προς τα μέσα σαν καπάκι με το άνοιγμα προς τα έξω (cup-shaped) και προσλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες που υπάρχουν στη επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, διαλυτές πρωτεΐνες του εξωκυττάρου περιβάλλοντος, λιπίδια, μεταβολίτες, μικρά μόρια και ιόντα ώστε *de novo* να σχηματίζεται το **πρώιμο ενδόσωμα (early-sorting endosome, ESE)** με την κυτταροπλασματική μεμβράνη να αποχωρίζεται από το κύτταρο και να περιβάλλει

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων εξωκυτταρίων κυστιδίων.²¹⁻²⁴

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ
Εξώσωμα	Οδός των ενδοσωμάτων	30-150 nm	Οι τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81, CD82), οι πρωτεΐνες ESCRT (σύμπλοκα ταξινόμησης των ενδοσωμάτων που χρειάζονται για την μεταφορά τους), η πρωτεΐνη TSG101 (πρωτεΐνη γονιδίου 101 ευαισθησίας όγκου), η πρωτεΐνη Alix (πρωτεΐνη X που αλληλεπιδρά με ALG-2) και η φλοτιλλίνη.	mRNA, miRNA, μη κωδικοποιητικά RNAs, πρωτεΐνες (από το κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων), λιπίδια.
Μικροκυστίδιο	Κυτταροπλασματική μεμβράνη με εκβλάστησή της προς τα έξω και την δημιουργία φυσαλίδων.	100-1000 nm	Οι τετρασπανίνες (CD40), οι ιντεγκρίνες & οι σελεκτίνες.	mRNA, miRNA, μη κωδικοποιητικά RNAs, πρωτεΐνες (κυτταρόπλασμα και κυτταροπλασματική μεμβράνη συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων), λιπίδια.
Αποπτωτικό σωματίο	Κυτταροπλασματικός θρυμματισμός κατά την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και κυτταρική σηματοδότηση για την άμεση εκκαθάριση των αποπτωτικών κυττάρων.	>1000 nm	Φωσφατιδυλοσερίνη, ιστόνες, κασπάση-3.	Πυρηνικά κλάσματα, κυτταρικά οργανίδια, πρωτεΐνες, λιπιδική μεμβράνη.

το πρώιμο ενδόσωμα.¹⁷ Ο πυρήνας, η συσκευή του Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα του κυττάρου συμμετέχουν στο περιεχόμενο του πρώιμου ενδοσώματος (ESE), που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.¹⁷ Το πρώιμο ενδόσωμα (ESE) ωριμάζει στο **όψιμο ενδόσωμα (late-sorting endosome, LSE)**.¹⁷ Στο περι-

εχόμενο του όψιμου ενδοσώματος συμμετέχει επίσης η συσκευή του Golgi.¹⁷ Η μεμβράνη του όψιμου ενδοσώματος εγκολπώνεται προς τα μέσα (δεύτερη ενδοκύττωση) και προσλαμβάνει υγρά του κυτταρικού κυτταροπλάσματος και τελικά παράγεται το **πολυκυστιδικό σωματίο (multivesicular body, MVB)** που περιέχει πολλά **ενδοσυλικά κυστίδια**



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των εξωσωμάτων.

(intraluminal vesicles, ILVs), τα οποία και είναι τα προ-εξωσώματα.¹⁷ Διάφορες πρωτεΐνες και συμπλέγματα πρωτεϊνών υπάρχουν στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων που μεσολαβούν στην βιογένεση των πολυκυστιδικών σωματιδίων (MVBs) με την δημιουργία των ενδοαυλικών κυστιδίων (ILVs).^{16,25} Ένας τέτοιος τύπος πρωτεϊνών μεταφορέων περιλαμβάνει τα σύμπλοκα ταξινόμησης των ενδοσωμάτων που χρειάζονται για τη μεταφορά τους (endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT) και ένας άλλος τύπος είναι ανεξάρτητος από τα ESCRT. Το ESCRT περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του κυτοσόλιου **ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II και ESCRT-III**.^{16,25,26} Στην συνέχεια όταν συντηχθούν τα πολυκυστιδικά σωματίδια (**MVBs**) με την κυτταρική μεμβράνη, τα προ-εξωσώματα εκκρίνονται από το κύτταρο ως εξωσώματα.^{16,25,26}

Η Εικόνα 1 παρουσιάζει σχηματικά την βιογένεση των εξωσωμάτων όπου παρατηρούνται τα εξής: Υγρό και εξωκυττάρια συστατικά όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, μεταβολίτες, μικρά μόρια και ιόντα εισέρχο-

νται στο κύτταρο με εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης προς τα έσω σαν καπάκι και με το άνοιγμα προς τα έξω που ονομάζεται ενδοκύττωση. Έτσι, *de novo* σχηματίζεται το πρώιμο ενδόσωμα (early-sorting endosome, ESE) με την κυτταροπλασματική μεμβράνη να αποχωρίζεται από το κύτταρο και να περιβάλλει το πρώιμο ενδόσωμα. Ο πυρήνας, η συσκευή του Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα του κυττάρου συμμετέχουν στο περιεχόμενο του πρώιμου ενδοσώματος (ESE), που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Το πρώιμο ενδόσωμα (ESE) οδηγεί στην δημιουργία του όψιμου ενδοσώματος (late-sorting endosome, LSE). Στο περιεχόμενο του όψιμου ενδοσώματος συμμετέχει επίσης η συσκευή του Golgi. Μια δεύτερη ενδοκύττωση συμβαίνει στο όψιμο ενδόσωμα ώστε να εισέρχονται εντός αυτού συστατικά του κυτταροπλάσματος και τελικά παράγεται το πολυκυστιδικό σωματίδιο (multivesicular body, MVB) που περιέχει πολλά ενδοαυτικά κυστιδία (intraluminal vesicles, ILVs), τα οποία και είναι

τα προ-εξωσώματα. Όταν τα πολυκυστικά σωματίδια συντηχθούν με την κυτταρική μεμβράνη, εκκρίνονται με εξωκύτωση τα εξωσώματα. Σύντηξη των πολυκυστικών κυστιδίων (MVBs) με τα λυσοσώματα προκαλούν αποδόμηση των πολυκυστικών κυστιδίων (MVBs), το φορτίο των οποίων ανακυκλώνεται από το κύτταρο. Σύντηξη των πολυκυστικών κυστιδίων (MVBs) με τα αυτοφαγοσώματα οδηγούν στον σχηματισμό των αμφισωμάτων τα οποία είτε υφίστανται τήξη με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και εκκρίνουν τα εξωσώματα με διαφορετικό φορτίο είτε υφίστανται πέψη από τα λυσοσώματα και το υλικό τους ανακυκλώνεται από το κύτταρο.

Πολλές πρωτεΐνες Rab, όπως είναι οι Rab7, Rab8, Rab11, Rab27 και Rab 35 που συνδέονται με τα πολυκυστιδικά σωματίδια (MVBs) διευκολύνουν την κίνηση των πολυκυστιδικών σωματίων (MVBs) προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη με διαφορετικούς τρόπους.^{16,25,27-30} Στην συνέχεια, οι πρωτεΐνες SNARE οδηγούν στη σύντηξη των πολυκυστιδικών σωματίων (MVBs) και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.^{27,29} Όμως τα πολυκυστιδικά σωματίδια (MVBs) δεν υφίστανται πάντα σύντηξη με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ώστε να εκκριθούν από τα κύτταρα τα ενδοαυλικά κυστίδια (ILV) των πολυκυστικών σωματίων (MVBs). Στην περίπτωση αυτή, τα προ-εξωσώματα είτε συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα, αποικοδομούνται και επαναχρησιμοποιούνται μέσω της ανακύκλωσης για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης,^{16,25} είτε συγχωνεύονται με τα αυτοφαγοσώματα της οδού της αυτοφαγίας για να δημιουργήσουν υβριδικά οχήματα που ονομάζονται αμφισώματα. Στη συνέχεια, τα αμφισώματα υφίστανται τήξη με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και είτε εκκρίνουν τα εξωσώματα με άλλο φορτίο είτε υφίστανται πέψη από τα λυσοσώματα.^{31,32} Τα μικροκυστίδια (MVs) παράγονται από την πλασματική μεμβράνη με εκβλάστησή της προς τα έξω και την δημιουργία φυσαλίδων,^{16,18,26} ενώ τα αποπτωτικά σωματίδια προέρχονται από τον κυτταροπλασματικό θρυματισμό κατά την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και την κυτταρική σηματοδότηση για την άμεση εκκαθάριση των αποπτωτικών κυττάρων.²⁶ Κατά την έκκριση στον εξωκυτταρικό χώρο, τα εξωκυτταρικά κυ-

στίδια (EVs) αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα-στόχους που βρίσκονται είτε σε κοντινή είτε σε μακρινή απόσταση με τρεις μηχανισμούς: α) την ενδοκύτωση, β) την αλληλεπίδραση υποδοχέα-συνδέτη και γ) την άμεση σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη.⁸

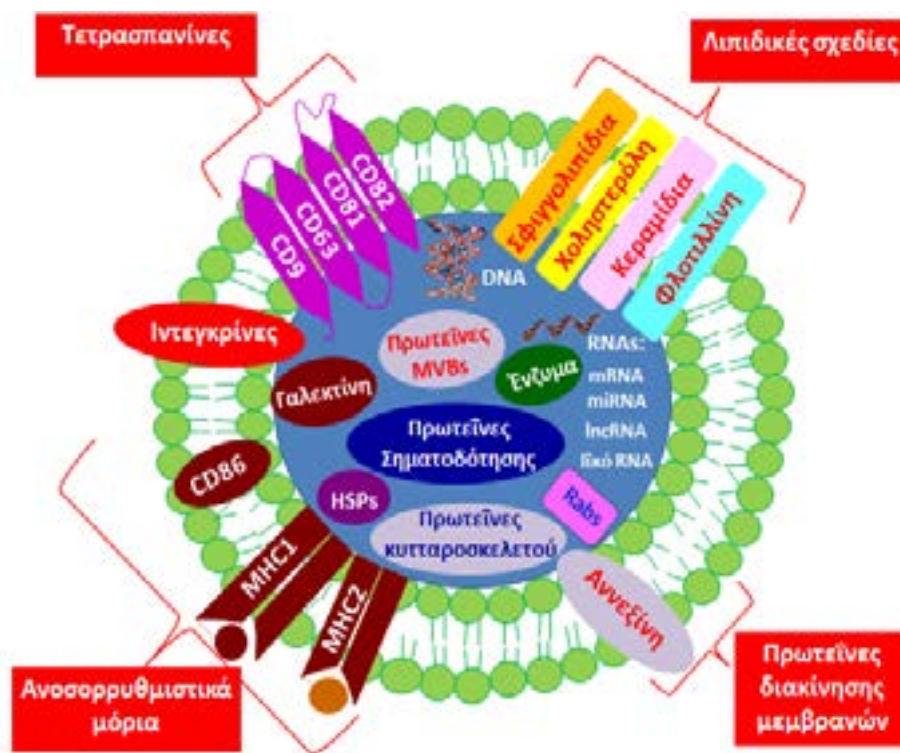
2. Βιολογικό φορτίο και περιεχόμενο των εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα περιλαμβάνουν μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων, πολυάριθμα mRNA, DNA, μη κωδικοποιητικά RNA και πρωτεΐνες και συμμετέχουν ενεργά στην κυτταρική επικοινωνία μεταφέροντας πρωτεΐνες και RNA σε κύτταρα και απομακρυσμένα όργανα.^{14,33} Τα εξωσώματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες τετρασπανίνης (CD9, CD63, CD82 και CD81) και άλλες πρωτεΐνες όπως Alix (πρωτεΐνη που ρυθμίζει κυτταρικούς μηχανισμούς), Tsg101 (πρωτεΐνη γονιδίου ευαισθησίας όγκου 101), MHC1 (κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας 1) και HSP90 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90).³⁴⁻³⁸ Τα εξωσώματα φαίνονται σφαιροειδή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης και έχουν πυκνότητα 1,08-1,19 g/ml.^{26,39} Αναλυτικά, το φορτίο/περιεχόμενο των εξωσωμάτων διακρίνεται ως εξής:

2.1. DNA. Τα εξωσώματα περιέχουν DNA, συμπεριλαμβανομένων του μονόκλωνου DNA, του δίκλωνου DNA, του γονιδιωματικού DNA, του μιτοχονδριακού DNA και του συμπληρωματικού DNA ανάστροφης μεταγραφής.⁴⁰⁻⁴³ Το DNA των εξωσωμάτων συντελεί στη ρύθμιση της φλεγμονής και είναι ένας χρήσιμος δείκτης ιογενούς λοίμωξης, νεοπλασίας και αντίστασης στην θεραπεία.^{43,44}

2.2. RNA. Τα εξωσώματα περιέχουν RNAs όπως μικρά πυρηνικά RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs), μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs (small noncoding RNAs, ncRNAs), μεταφορικά RNAs (transfer RNAs, tRNAs), αποθηκευτικά RNAs (vault RNAs), επαναλαμβανόμενα RNAs (repetitive element RNAs), κατατμημένα RNAs (fragmented RNAs) και φυσικά microRNAs (miRNAs).^{43,45}

2.3. Κυτταροκίνες. Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα μακροφάγα κύτταρα και τα ανοσοκύτταρα φέρουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες μεσολαβούν στην φλεγμονώδη απάντηση και τις



Εικόνα 2. Σύθεση των εξωσωμάτων.

παθολογικές καταστάσεις.^{43,46} Για παράδειγμα, τα εξωσώματα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας φέρουν στην μεμβράνη τους τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου - άλφα (TNF-α), ο οποίος ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (nuclear factor κB, NF-κB) και την μεταλλοπρωτεϊνάση 1 του στρώματος (matrix metalloproteinase-1, MMP-1).^{43,47} Έτσι παράγονται οι κυτοκίνες IL-6 και IL-1β, σχηματίζονται οστεοκλάστες και εκλύεται ο φλεγμονώδης καταρράκτης.^{43,48-50} Η IL-1β εκκρίνεται επίσης από τα εξωσώματα και δρα συνεργικά με την IL-6 με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της IL-6 καθώς και μεταξύ άλλων της IL-8 και της προσταγλανδίνης E₂-PGE₂.^{43,51,52}

2.4. Ένζυμα. Τα εξωσώματα περιέχουν διάφορα ένζυμα όπως λιπάσες, γλυκοσυλτρανσφεράσες, πρωτεάσες και γλυκοζιδάσες.⁴³

2.5. Λιπίδια. Τα εξωσώματα περιέχουν λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης όπως είναι η χοληστερόλη (Chol), η σφιγγομυελίνη, η φωσφατιδυλολινοσιτόλη (PI), τα γλυκοσφιγγολιπίδια, η φωσφατιδυλοχολίνη

(PC), τα κεραμίδια (ceramides), οι φωσφατιδυλαιθανολαμίνες (PE), η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και το φωσφατιδικό οξύ (PA).^{43,53} Εκτός από τον δομικό ρόλο των λιπιδίων στην κατασκευή της μεμβράνης του εξωσώματος, αυτά είναι σημαντικά για τον σχηματικό των εξωσωμάτων και την απελευθέρωσή τους στον εξωκυττάριο χώρο.⁵³ Η συνολική συγκέντρωση των λιπιδίων στα εξωσώματα διαφέρει από εκείνη του πλάσματος και των άλλων κυτταρικών μεμβρανών και εξαρτάται κυρίως από τα κύτταρα παραγωγής τους.⁵⁴⁻⁵⁶ Η περιεκτικότητα των λιπιδίων στα εξωσώματα επηρεάζει τις ιδιότητες των εξωσωμάτων.⁵⁶

2.6. Πρωτεΐνες. Η σύνθεση των κοινών πεπτιδίων και πρωτεϊνών που περιέχονται στα εξωσώματα είναι ανεξάρτητη από τον κυτταρικό τύπο προέλευσης.⁵⁶ Οι κοινές πρωτεΐνες των εξωσωμάτων περιλαμβάνουν (α) τις πρωτεΐνες των πολυκυστιδικών σωματιδίων (MVBs) (ή σύμπλεγμα ενδοσωμικής ταξινόμησης, endosomal-sorting complex), όπως ALG-2-interacting protein X, ALIX και susceptibility gene

101, TSG101 και vasuolar protein sorting-associated protein 4, VPS4, (β) την έλικα των τεσσάρων-δια-μεμβρανικών διασταυρούμενων πρωτεϊνών (four-transmembrane helix containing proteins, 4TMs) όπως τις CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD106, την τετρασπατίνη-8 (Tspan8) and την ICAM-1 (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1), οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με μόρια ιντεγκρίνης ή το κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) και να σχηματίζουν σύμπλοκα, (γ) τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεμβρανική μεταφορά, την μεμβρανική σύντηξη και την απελευθέρωση των εξωνίων όπως είναι οι κυτοσολικές πρωτεΐνες, οι αννεξίνες (I, II, V και VI), η Ras-σχετιζόμενη σύνδεση (Ras-associated binding, Rab)-GTPase, οι διαλυτοί υποδοχείς πρωτεϊνών προσκόλλησης παράγοντα ευαίσθητου στο N-αιθυλομηλεϊμίδιο (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptors, SNAREs) και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) όπως Hsp20, Hsp60, Hsp70, Hsp90, (δ) άλλες πρωτεΐνες όπως τις ιντεγκρίνες, ακτίνη, μυοσίνη, κοφιλίνη και τουμπουλίνη, οι οποίες είναι κοινά συστατικά των εξωσωμάτων και συμμετέχουν στην βασική δομή των εξωσωμάτων όπως είναι ο κυτταροσκελετός των εξωσωμάτων.^{43,57-59} Στα εξωσώματα οι ειδικές πρωτεΐνες εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και την κατάσταση των κυττάρων από τα οποία προέρχονται τα εξωσώματα. Για παράδειγμα, οι ειδικές πρωτεΐνες των εξωσωμάτων (cGMP-dependent protein kinase 1, PKG1) και x-box-binding protein 1, (NFX1) ανιχνεύονται μόνο στα εξωσώματα που βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος.⁶⁰

Η Εικόνα 2 παρουσιάζει σχηματικά τη σύνθεση των εξωσωμάτων, όπου επισημαίνονται τα εξής: Τα εξωσώματα είναι μικροσκοπικοί εξωκυττάριοι σάκκοι. Ο ρόλος των εξωσωμάτων είναι να καθαρίζουν τα κύτταρα από λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα και να μεταφέρουν μηνύματα από κύτταρο σε κύτταρο. Τα εξωσώματα αποτελούνται από διάφορους τύπους πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες των εξωσωμάτων στην μεμβράνη τους (λιπιδική διπλοστοιβάδα) μεταξύ άλλων είναι (1) τα ανοσορρυθμιστικά μόρια της γαλεκτίνης, του CD89 και του συμπλέγματος μεγάλης ιστοσυμβατότητας -1 (MHC-1) και -2 (MHC-

2), (2) οι ιντεγκρίνες, (3) οι τετρασπανίνες όπως η συστάδα διαφοροποίησης 9 (CD9), η συστάδα διαφοροποίησης 63 (CD63), η συστάδα διαφοροποίησης 81 (CD81) και η συστάδα διαφοροποίησης 82 (CD82) και (4) οι πρωτεΐνες διακίνησης μεμβρανών όπως οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το Ras (Rabs) και η αννεξίνη. Ακόμα, τα εξωσωματικά στην διλιπιδαιμική τους μεμβράνη τους περιέχουν τις λιπιδικές σχεδίες όπως είναι η σφιγγομυελίνη, η χοληστερόλη, τα κεραμίδια (ceramides) και η φλοτιλλίνη. Επίσης, τα εξωσώματα στο εσωτερικό τους περιέχουν τις τσαπερόνες όπως είναι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), HSP60, HSP70 και HSP90 και η τσαπερόνη θερμικού σοκ 70 (HSC70). Ακόμα, τα εξωσώματα στο εσωτερικό τους περιέχουν πρωτεΐνες σηματοδότησης, όπως είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1a (hypoxia-inducible factor-1a, HIF-1a), η πρωτεΐνη ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης 42 (CDC42), οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K), ο παράγοντας ADP-ριβοςυλίωσης 1 (ADP-ribosylation factor 1, ARF1) και η β-κατενίνη. Επιπρόσθετα, τα εξωσώματα στο εσωτερικό τους περιέχουν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως είναι η ακτίνη, η μυοσίνη (myosin), η βιμεντίνη, η τουμπουλίνη, η φιβρονεκτίνη (fibronectin), η κοφιλίνη, η προφιλίνη, η ταλίνη και οι κερατίνες. Επιπλέον, τα εξωσώματα στο εσωτερικό τους περιέχουν MVBs πρωτεΐνες, όπως είναι η πρωτεΐνη X που αλληλεπιδρά με ALG-2 (ALG-2-interacting protein X, Alix), η πρωτεΐνη γονιδίου 101 ευαισθησίας όγκου (tumor susceptibility gene 101 protein, Tsg101), η κλαθρίνη (clathrin) και η ουβικιτίνη (ubiquitin). Επιπρόσθετα, τα εξωσώματα περιέχουν διάφορα ένζυμα όπως λιπάσες, γλυκοσυλτρανσφεράσες, πρωτεάσες και γλυκοζιδάσες. Τέλος, τα εξωσώματα βρέθηκαν να περιέχουν νουκλεϊκό οξύ, συμπεριλαμβανομένου του DNA, του mRNA, του miRNA, του ιικού RNA και του μακρύ μη κωδικοποιητικού RNA (lncRNA).

3. Μέθοδοι απομόνωσης και ποσοτικοποίησης των εξωσωμάτων.

Η απομόνωση των εξωσωμάτων γίνεται με την υπερφυγοκέντρηση (ultra-centrifugation) του αίμα-

τος και την μέτρηση των μικροσκοπικών σωματιδίων (30-150 nm) με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Ο ποιοτικός εντοπισμός των εξωσωμάτων γίνεται με μεθόδους, όπως είναι η ELISA και η ανοσοαποτύπωση (Western blot ανάλυση) στηριζόμενη στην ανίχνευση των ειδικών πρωτεϊνών (βιοδεικτών) που εκφράζουν τα εξωσώματα, όπως είναι οι τετρασπανίνες (π.χ. CD9, CD63, CD81, CD82), η πρωτεΐνη ESCRT, η TSG101 (πρωτεΐνη γονιδίου 101 ευαισθησίας όγκου), η Alix (πρωτεΐνη X που αλληλεπιδρά με ALG-2) και η φλοτιλλίνη-1. Επίσης, τα εξωσώματα μπορούν να αναλυθούν με την ανίχνευση των ειδικών για αυτά miRNAs που έχουν. Η αναγνώριση των εξωσωμάτων με μεθόδους, όπως είναι η σάρωση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης είναι πολύ δαπανηρές μέθοδοι και δεν συνιστώνται.

4. Ο ρόλος των εξωσωμάτων σε φυσιολογικές λειτουργίες, παθοφυσιολογικές καταστάσεις και νοσήματα.

Τα εξωσώματα έχουν μια πληθώρα λειτουργιών. Παραδοσιακά τα εξωσώματα θεωρούνταν ότι μετέφεραν εκτός κυττάρου τα άχρηστα συστατικά του. Όμως στην πορεία ανακαλύφθηκε ότι τα εξωσώματα μπορούν να επικοινωνούν με τα διάφορα κύτταρα του οργανισμού με τα RNAs που μεταφέρουν. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, επί εισόδου κάποιου αντιγόνου π.χ. παθογόνου μικροοργανισμού στον οργανισμό παράγονται εξωσώματα από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία συμβάλλουν: α) στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και β) στην ανοσοενίσχυση του οργανισμού με την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Έτσι, τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα B-κύτταρα μεταφέρουν τα συμπλέγματα μεγάλης ιστοσυμβατότητας-1 (MHC-1) και -2 (MHC-2) με τα αντιγόνα στα βοηθητικά T- κύτταρα CD8⁺ (helper cells) με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Παράλληλα τα μακροφάγα κύτταρα που μολύνονται από παθογόνους μικροοργανισμούς εκκρίνουν εξωσώματα, τα οποία έχουν τα συμπλέγματα μεγάλης ιστοσυμβατότητας-1 (MHC-1) και -2 (MHC-2) με τα αντιγόνα με αποτέλεσμα i) την ωρίμανση των δεν-

δριτικών κυττάρων και ii) την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών με αποτέλεσμα την ανοσοενίσχυση.^{61,62} Στη συνέχεια, τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που είναι παρούσιάζουν τα εξωσώματα με τα συμπλέγματα μεγάλης ιστοσυμβατότητας-1 (MHC-1) και -2 (MHC-2) με τα αντιγόνα στα κυτταροτοξικά T-κύτταρα CD8⁺.^{61,63} Τα εξωσώματα εκτός από την παραπάνω ανοσοδιεγερτική δράση έχουν και ανοσοτροποποιητική δράση, δηλαδή στρέφονται κατά της ανοσιακής απάντησης.^{64,65} Συγκεκριμένα, τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα (καρκινικά εξωσώματα) μπορεί να προκαλέσουν απόπτωση των T-κυττάρων διαμέσου των μορίων της επιφανείας τους όπως είναι η γαλεκτίνη-9 και το σύμπλοκο Fas (Fas ligand, FasL).⁶¹ Άλλες ανοσοκατασταλτικές δράσεις των καρκινικών εξωσωμάτων είναι: (α) η αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων, (β) η μείωση της κυτταροτοξικότητας των φονικών T-κυττάρων CD8⁺ και (γ) η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε κατασταλτικά κύτταρα προερχόμενα από μυελοειδή αντί για δενδριτικά κύτταρα.⁶¹ Επίσης, τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.⁶⁶ Στην αρχή της εγκυμοσύνης η τροφοβλάστη εκκρίνει εξωσώματα, τα οποία διεγείρουν τα μακροφάγα κύτταρα του αίματος ώστε να παράγουν και να απελευθερώσουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως IL-1β ώστε να αποφευχθεί η ανοσολογική απόρριψη του εμβρύου για να επιτευχθεί η εμφύτευσή του στην συνέχεια.⁶⁷ Επίσης, ο πλακούντας και ο προστάτης εκκρίνουν εξωσώματα προκειμένου να μειώσουν την ανοσιακή δραστηριότητα και να προωθήσουν φυσιολογικές λειτουργίες όπως αυτή της γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης.⁶⁸ Συγκεκριμένα τα εξωσώματα του σπέρματος και του πλακούντα εκφράζουν τον NKG2D συνδέτη (ligand) που προσδένεται στον υποδοχέα NKG2D των κυττάρων φυσικών φονέων (NK, natural killer cells) ώστε να ανασταλεί η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων και να προστατευθούν το σπέρμα και το έμβρυο από ανοσοποιητική επίθεση από τους ιστούς του ξενιστή για να προχωρήσει η γονιμοποίηση και εγκυμοσύνη.⁶⁹⁻⁷¹ Παράλληλα, τα εξωσώματα που προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να προάγουν την αναγέννηση των ιστών και

την επούλωση των πληγών μέσω της αγγειογένεσης που προκαλείται από το miRNA-21-3p και της προώθησης της λειτουργίας των ινοβλαστών⁷²⁻⁷⁴ και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον κοσμητική ιατρική. Συγκεκριμένα, τα βλαστικά κύτταρα εκκρίνουν κολλαγόνο τύπου I και III, υαλουρονικό οξύ και θειϊκή χονδροϊτίνη και κατ' επέκταση και τα εξωσώματα που παράγονται από αυτά. Επίσης, τα βλαστικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως τον αυξητικό παράγοντα των νευρών (NGF), τον αυξητικό παράγοντα των βασικών ινοβλαστών, τον παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (SCF) και τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF). Τα εξωσώματα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.^{75,76} Συγκεκριμένα, τα εξωσώματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μπορούν να αυξάνουν τα βασικά επίπεδα της μυελίνης, η οποία είναι η θήκη που περιβάλλει τα νεύρα και στην πολλαπλή σκλήρυνση η μυελίνη καταστρέφεται.⁷⁷ Επίσης, τα εξωσώματα μπορούν να απομακρύνουν το βήτα-αμυλοειδές που συσσωρεύεται στον οργανισμό στην νόσο του Αλτσχάιμερ⁷⁸ και επιπρόσθετα, να βελτιώσουν τα εγκεφαλικά επεισόδια με την αποκατάσταση της παροχής του αίματος με την αναδιαμόρφωση των εγκεφαλικών αγγείων και την αναστολή της νευροφλεγμονής.⁷⁹ Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) ενισχύουν τη μετάδοση και την εξάπλωση των ιικών σωματιδίων σε συγκεκριμένες ασθένειες.^{80,81} Επίσης, βοηθούν στη μετάσταση και την ογκογένεση.^{82,83} Επιπρόσθετα, τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) χρησιμεύουν ως φορείς για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου σε κύτταρα στόχους που νοσούν.⁸⁴ Παράλληλα, τα εξωσώματα που προέρχονται από φλεγμονώδη ή καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη εμβολίων για τις αντίστοιχες νόσους.^{85,86}

4.1. Ο ρόλος των εξωσωμάτων στην παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και το μεταβολικό σύνδρομο (MetS). Ο επιπολασμός της παχυσαρκίας τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί σημαντικά και αποτελεί μία χρόνια μεταβολική πολυπαράγοντική νόσο.^{87,88} Έχει βρεθεί ότι τα miRNA των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων που εκκρίνονται πρωτίστως από τον λιπώδη ιστό παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ παχύσαρκων ασθενών και υγιών ατόμων.⁸⁹ Τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ του λιπώδους ιστού και άλλων ιστών, συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεση της παχυσαρκίας και τις σχετικές με αυτή ασθένειες.⁹⁰ Όμως τα miRNA των εξωσωμάτων που κυκλοφορούν στο πλάσμα καταστέλλουν την αποικοδόμηση των λιπιδίων στο λευκό λίπος στους παχύσαρκους ασθενείς μειώνοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα υποδοχέας που ενεργοποιείται από τον πλασισιαστή του υπεροξισώματος-α (PPARα).⁹¹ Επίσης, τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου και των σχετιζόμενων με αυτό νοσημάτων.^{92,93} Τα εξωσώματα μεταφέρουν μεταβολίτες και διευκολύνουν την κύτταρο-προς-κύτταρο επικοινωνία μέσω της ανταλλαγής των miRNAs τους μεταξύ των παγκρεατικών β-κυττάρων, του λιπώδους ιστού, των σκελετικών μυών και του ήπατος.⁹³ Τα β-κύτταρα του παγκρέατος παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης με την έκκριση ινσουλίνης.⁹³ Τα miRNAs έχουν θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη, ωρίμανση, επιβίωση και λειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων,⁹³ ενώ σε διαβητικά μοντέλα ζώων και σε διαβητικούς ανθρώπους έχει βρεθεί απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs.⁹³⁻⁹⁵ Τα εξωσώματα μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα του ήπατος, του λιπώδους ιστού και των σκελετικών μυών και να ρυθμίσουν την μεταγωγή της οδού σηματοδότησης της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την ανάπτυξη IR.⁹⁶ Η αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) συμβάλλει στην δημιουργία του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) και στην ανάπτυξη των σχετιζόμενων με αυτό νοσημάτων, όπως του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και της υπέρτασης.^{87,97} Σε παχύσαρκα ποντίκια έχει βρεθεί ότι τα εξωσώματα που μεταφέρουν στα ηπατοκύτταρα miR-155 και τα οποία εκκρίνονται από τα μακροφάγα του λιπώδους ιστού, ρυθμίζουν προς τα κάτω (down-regulate) τον μεταφορέα γλυκόζης-4 (Glut-4) στο ήπαρ στοχεύοντας τον υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πλασισιαστή του υπεροξισώματος (PPAR) με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη στο ήπαρ και την επιδείνωση

του σακχαρώδη διαβήτη.⁹⁸ Επίσης, έχει βρεθεί σε ποντίκια που σιτίζονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά ότι το miRNA-141-3p, που περιέχεται στα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα απορροφάται από τα ηπατοκύτταρα και μειώνει σημαντικά την ευαισθησία στην ινσουλίνη στο ήπαρ.⁹⁹ Επιπρόσθετα, τα εξωσώματα ρυθμίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη με άμεση δράση στον υποδοχέα της ινσουλίνης.⁹⁶ Έχει βρεθεί σε Zucker διαβητικά παχύσαρκα ποντίκια ότι τα εξωσώματα που παράγονται από τον λιπώδη ιστό και φέρουν miR-29a-3p επιδεινώνουν σημαντικά την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) στο ήπαρ μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και μείωσης της έκφρασης του υποστρώματος-1 του υποδοχέα ινσουλίνης (insulin receptor substrate 1, IRS1).¹⁰⁰ Ακόμα, τα εξωσώματα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη (IR) στον λιπώδη ιστό.⁹⁶ Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι στα νεαρά ποντίκια τα εξωσώματα που περιέχουν miRNA-29b-3p και προέρχονται από τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών (BM-MSCs) μπορούν να επάγουν την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) στον λιπώδη ιστό με την καταστολή της σιρτουίνης 1 (Sirt1).¹⁰¹ Επιπλέον, έχει βρεθεί σε μελέτες που διεξήχθησαν σε μοντέλα ποντικών καθώς και σε ανθρώπους ότι τα miR-15a, miR-375, miR-126, miR-1 και miR-133 των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων μεταβάλλονται κατά τα πρώιμα στάδια του σακχαρώδη διαβήτη και συνεπώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες για τον σακχαρώδη διαβήτη.¹⁰² Εκτός των παραπάνω αρνητικών επιπτώσεων των εξωσωμάτων στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στον σακχαρώδη διαβήτη έχουν αναφερθεί και ευεργητικά αποτελέσματα των εξωσωμάτων. Για παράδειγμα, ο Wang και συν χρησιμοποίησαν μοντέλα ποντικών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και βρήκαν ότι το miR-1249-3p των εξωσωμάτων που προέρχονται από κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer cell-derived exosomes) εξασθενεί αποτελεσματικά την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) και τη χρόνια φλεγμονή στα λιποκύτταρα και ηπατοκύτταρα μέσω του άξονα SKOR1-SMAD6-TLR4-NF-B, βελτιώνοντας έτσι τον μεταβολισμό της γλυκόζης.¹⁰³

4.2. Εφαρμογή των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες στις διάφορες ασθένειες. Τα εξωσώματα βρίσκονται σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως τα ούρα, το σάλιο, τον ορό του αίματος και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) καθώς και σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα δενδριτικά κύτταρα, τα B-κύτταρα και τα T-κύτταρα.^{26,104,105} Επομένως, τα εξωσώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για εξατομικευμένη και ακριβή διάγνωση και θεραπεία πολλών παθήσεων του οργανισμού με την μέθοδο της μη επεμβατικής υγρής βιοψίας αποφεύγοντας έτσι την στερεά βιοψία, η οποία είναι μια επεμβατική ιατρική διαδικασία, με δυσκολίες μερικές φορές στην επίτευξή της, τα προβλήματά της στην ορθή διάγνωση λόγω της ετερογένειας που εμφανίζουν κάποιοι τύποι καρκίνων και τις πιθανές επιπλοκές κατά την διενέργειά της όπως λοιμώξεις και τραυματισμό γειτονικών οργάνων με εμφάνιση αιμορραγίας.¹⁰⁶

4.2.1. Καρκινικά εξωσώματα (tumor derived exosomes, TDEs) ως καρκινικοί δείκτες. Τα καρκινικά εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα διακινούνται ελεύθερα και σε αυξημένο αριθμό στα περισσότερα σωματικά υγρά όπως είναι ο ορός του αίματος και τα ούρα.¹⁰⁷ Ο προσδιορισμός του τροποποιημένου φορτίου των καρκινικών εξωσωμάτων (TDEs), σε απλή υγρή βιοψία ορού αίματος και ούρων μπορεί να ανιχνευθεί με μεθόδους μεταγραφομικής, πρωτεωμικής και λιποδομικής και έχει συσχετισθεί με την εξέλιξη του όγκου και τον σχηματισμό μεταστάσεων.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Οι πρωτεΐνες των καρκινικών εξωσωμάτων είναι χρήσιμοι βιοδείκτες σε πολλούς τύπους καρκίνων.¹¹² Ο Melo και συν βρήκαν ότι τα καρκινικά εξωσώματα στα οποία ανιχνεύεται η πρωτεογλυκάνη-1 (GPC1) στον ορό του αίματος είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του παγκρέατος.¹¹³ Στον καρκίνο του προστάτη, ο Bijnstorp και συν αποκάλυψαν ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ιντεγκρίνη B1 (ITGB1) και ιντεγκρίνη άλφα 3 (ITGA3) ήταν μεγαλύτερη στα εξωσώματα των ούρων των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη συγκριτικά με την καλοήγη υπερπλασία του προστάτη και τα πρώιμα στάδια του καρκίνου

αυτού.¹¹⁴ Ακόμη, ο Hoshino και συν έδειξαν ότι οι ιντεγκρίνες A6β1 και A6β4 των εξωσωμάτων συσχετίστηκαν με την μετάσταση του καρκίνου στους πνεύμονες, ενώ η ιντεγκρίνη ανβ5 συνδέθηκε με την μετάσταση του καρκίνου στο ήπαρ. Συνεπώς, οι ιντεγκρίνες των εξωσωμάτων θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη των μεταστάσεων σε συγκεκριμένα όργανα.¹¹⁵ Επίσης, ο Standfeld-Paulsen και συν αποκάλυψαν ότι οι βιοδείκτες CD151, CD171 και τετρασπανίνη 8 των εξωσωμάτων στο πλάσμα του αίματος ήταν σημαντικοί για τον διαχωρισμό των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα από τα υγιή άτομα.¹¹⁶ Επιπρόσθετα, ο Maji και συν κατέδειξαν ότι η έκφραση της ανεξίνης A2 ήταν υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα του μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά και έπαιζε σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης με την ενεργοποίηση διαμέσου των μακροφάγων, των μονοπατιών p38MAPK, NF-κB και STAT3 και της αυξημένης έκκρισης των IL-6 και TNF-alpha.¹¹⁷ Ομοίως, ο Tiedemann και συν βρήκαν ότι η έκκριση της L-πλαστίνης και της περοξιδροξίνης-4 (PRDX4) από τα καρκινικά εξωσώματα στον καρκίνο του μαστού μεσολαβούν στην μεταστατική οστεόλυση των οστών μέσω της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών και θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για την πρόγνωση του προχωρημένου καρκίνου μαστού.¹¹⁸ Η εκτίμηση του φορτίου των καρκινικών εξωσωμάτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία σχετίζονται με την έγκαιρη ανίχνευση ενός όγκου, την ακριβή διάγνωση του ιστολογικού τύπου και βαθμού, την πρόβλεψη της ανταπόκρισης ή αντίστασης του όγκου στην επικουρική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, την εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου και του προσδόκιμου επιβίωσης ενός ασθενούς.^{104-111,118} Στα δίκλωνα DNA των καρκινικών εξωσωμάτων μπορούν να ανιχνευθούν μεταλλάξεις γονιδίων ώστε τα εξωσώματα να καθίστανται χρήσιμοι βιοδείκτες για την διάγνωση του καρκίνου και την διαφορική διάγνωση του καρκίνου από καλοήθεις καταστάσεις.¹¹¹ Για παράδειγμα, στον καρκίνο του παγκρέατος, ο Alleson και συν βρήκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras στο DNA των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων σε υψηλά ποσοστά 66,7% έως 85% ανάλογα με το στάδιο της νόσου.¹¹⁹ Ομοίως, στον καρκίνο του πα-

γκρέατος ο Bernard και συν βρήκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras σε ποσοστό 95%.¹²⁰ Επιπρόσθετα, ο Lux και συν βρήκαν ότι η έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου μεσεκχυματικός επιθηλιακός μεταβατικός παράγοντας (mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met) και του συνδέτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) στα εξωσώματα που κυκλοφορούσαν στο ορό του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος είχαν αρνητική προγνωστική αξία ως προς την επιβίωση των ασθενών.¹²¹ Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), η ανίχνευση της μετάλλαξης T790M του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) στο εξωσωματικό RNA/DNA είναι μεγάλης διαγνωστικής αξίας προς αποφυγή περιττών συμπαγών βιοψιών του όγκου.¹²² Ο Qu και συν βρήκαν ως βιοδείκτη στο καρκίνωμα του νεφρού ένα μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA (long non-coding RNA, lncRNA) που ενεργοποιείται στο καρκίνωμα του νεφρού με αντίσταση στην σουνιτινίδη (activated in renal cell carcinoma with sunitinib resistance, lncARSR).¹²³ Ο βιοδείκτης lncARSR μεταφέρεται με τα καρκινικά εξωσώματα και προωθεί την αντίσταση στην σουνιτινίδη των καρκινικών κυττάρων του νεφρού μέσω της υπερέκφρασης των c-MET και AXL και έχει συνεπώς αρνητική προβλεπτική αξία στην χημειοθεραπεία των ασθενών με σουνιτινίδη.¹²³ Επίσης, η μελέτη της ανάπτυξης διαφόρων miRNAs έχει προταθεί για την διάγνωση διαφόρων τύπων καρκίνων όπως των miRNA-200-5p, miRNA-378a, miRNA-139-5p και miRNA-379 για το καρκίνωμα του πνεύμονα.¹²⁴ και του miRNA-21-5p για το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του οισοφάγου.¹²⁵ Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχουν βρεθεί αυξημένα πολλαπλά miRNAs των εξωσωμάτων στα ούρα των ασθενών και μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.¹²⁶ Επιπρόσθετα, διάφορα miRNAs φαίνεται να σχετίζονται με μεταστάσεις ή υποτροπή του καρκίνου.^{111,127} Ο Zeng και συν πρότειναν ότι η υπερέκφραση του miR-193a στα καρκινικά εξωσώματα του ορού του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου εμπλέκεται στον σχηματισμό προμεταστατικών θέσεων διαμέσου της προώθησης της

αγγειακής διαπερατότητας και αγγειογένεσης.¹²⁸ Ο Meltzer και συν βρήκαν αυξημένα επίπεδα των miR-141-3p και miR-375 στα καρκινικά εξωσώματα των ασθενών με καρκίνο του ορθού και μετάσταση στο ήπαρ σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς ηπατικές μεταστάσεις.¹²⁹ Ο Hu και συν αποκάλυψαν έναν άλλο μηχανισμό ηπατικών μεταστάσεων στον καρκίνο του παχέος εντέρου διαμέσου των εμπλουτισμένων σε miRNA-92a-3p καρκινικών εξωσωμάτων στον ορό του αίματος, τα οποία παράγονται από τους ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (cancer associated fibroblasts, CAFs).¹³⁰ Οι ερευνητές βρήκαν ότι το miR-92a-3p προήγε την μετανάστευση, διήθηση και μετάσταση καθώς και την αντίσταση στην χημειοθεραπεία με 5-FU/οξαλιπλατίνη (L-OHP) στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.¹³⁰ Επίσης, η έκφραση των miRNA-21-5p,¹³¹ miRNA-92a-3p,¹³² miR-17-5p,¹³³ και miRNA-548c-5p¹³³ των καρκινικών εξωσωμάτων στο πλάσμα του αίματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόωπη ανίχνευση της ηπατικής μετάστασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ο Wei και συν απέδειξαν ότι το miR-222-3p των εξωσωμάτων στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων (NSCLC) μπορεί να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την μετανάστευσή τους, την ικανότητά τους για διήθηση καθώς και την αντίσταση στην χημειοθεραπεία με γεμισταβίνη στοχεύοντας απευθείας τον υποκινητή του καταστολέα της σηματοδότησης των κυτοκινών 3 (suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3) και συνεπώς θα μπορούσε να είναι ένας αρνητικός προβλεπτικός δείκτης στην χημειοθεραπεία των ασθενών αυτών.¹³⁴

4.2.2. Τα εξωσώματα ως δείκτες καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVDs) αποτελούν σοβαρά προβλήματα υγείας του ανθρώπου και ιδιαίτερα η στεφανιαία νόσος, η οποία παγκοσμίως παραμένει η κύρια αιτία θανάτου.¹³⁵ Οι βιοδείκτες των καρδιαγγειακών νοσημάτων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στην κλινική πράξη και υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων περιλαμβάνουν τα αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότη-

τας (LDL).^{136,137} Στους βιοδείκτες του εμφράγματος του μυοκαρδίου περιλαμβάνονται η τροπονίνη και η ισομορφή της κινάσης κρεατινίνης CK-MB.^{136,137} Μετά από πολυετή έρευνα έχειδειχθεί ότι τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στα καρδιαγγειακά νοσήματα και θα μπορούσαν να έχουν προγνωστικό ρόλο ως βιοδείκτες. Ο Kuwabara και συν βρήκαν ότι τα αυξημένα επίπεδα του microRNA-133 στον ορό του αίματος ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο, οφείλονταν στην καταστροφή του μυοκαρδίου.¹³⁸ Επίσης, ο Goren και συν πρότειναν ότι σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, τα αυξημένα επίπεδα στον ορό του αίματός τους των miR-22, miR-320a, miR-423-5p και miR-92b είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για την διάγνωση και πρόγνωση της νόσου αυτής.¹³⁹ Ομοίως, ο Matsumoto και συν κατέδειξαν ότι στους ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου υπήρχαν αυξημένα miR-34a, miR-192 και miR-194 στα εξωσώματα του ορού του αίματός τους εντός έτους μετά από οξύ καρδιακό επεισόδιο.¹⁴⁰ Στην συνέχεια, ο Barile και συν βρήκαν ότι τα εξωσώματα που περιείχαν miR-210 και miR-132 εμφάνιζαν καρδιοπροστατευτική λειτουργία.¹⁴¹ Επιπρόσθετα ο Liu και συν βρήκαν ότι τα μικροκυστίδια που προερχόταν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και περιείχαν miR-92A-3p ρύθμιζαν την αγγειογένεση μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από την θρομβοσπονδίνη-1 (thrombospondin-1, THBS-1).¹⁴² Σε αντίθεση, ο Li και συν κατέδειξαν ότι τα εξωσώματα που περιείχαν miR-939-5p ανέστειλαν την αγγειογένεση μέσω της οδού σηματοδότησης του μονοξειδίου του αζώτου υποδειλώνοντας έτσι την αρνητική προβλεπτική αξία του miR-939-5p στα καρδιαγγειακά νοσήματα.¹⁴³ Εκτός από τα miRNAs που περιέχονται στα εξωσώματα και οι πρωτεΐνες τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Για παράδειγμα, ο Kanhai και συν πρότειναν ότι σε ασθενείς με κλινική εκδήλωση αγγειακής νόσου, τα αυξημένα επίπεδα της κυστατίνης C, της σερίπνης F2 και της συστάδας διαφοροποίησης 14 (cluster of differentiation 14, CD14) στα μικροκυστίδια του πλάσματός τους σχετιζόταν με τον αυξημένο κίνδυνο μελλοντικής επανεμφάνισης του αγγειακού επεισοδίου.¹⁴⁴ Επίσης, ο Berezen και συν (2015) κατέδειξαν σε ασθενείς με οξεία μη αντιρροπούμενη

χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια ότι η αυξημένη αναλογία των θετικών ενδοθηλιακών αποπτωτικών μικροσωματιδίων σε συστάδα διαφοροποίησης 31 (CD31) και αννεξίνη V (CD31⁺/Αννεξίνη V⁺) προς τα μονοπύρρηνα προγονικά κύτταρα συσχετίστηκε με δυσμενή κλινική έκβαση της νόσου αυτής.¹⁴⁵

5. Θεραπευτικές εφαρμογές των εξωσωμάτων.

Η εξέλιξη συγκεκριμένων νοσημάτων μπορεί να αντιμετωπισθεί με την θεραπευτική στόχευση των εξωσωμάτων με τους παρακάτω τρεις τρόπους: α) την αναστολή της παραγωγής των εξωκυτταρίων κυστιδίων, β) την αναστολή της απελευθέρωσης των εξωκυτταρίων κυστιδίων και γ) την στόχευση των συστατικών των εξωκυτταρίων κυστιδίων και την αναστολή της πρόσληψής τους από τα κύτταρα στόχους. Για παράδειγμα, η αναστολή της παραγωγής των εξωκυτταρίων κυστιδίων μπορεί να γίνει με την αναστολή του σχηματισμού των σεραμιδών.¹⁴⁶ Η αναστολή της απελευθέρωσης των εξωκυτταρίων κυστιδίων μπορεί να γίνει με τον φραγμό των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ESCRT και Rab.^{147,148} Η στόχευση των συστατικών των εξωκυτταρίων κυστιδίων μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους (α) με την στόχευση των υποδοχέων των εξωκυτταρίων κυστιδίων,¹⁴⁹ (β) με την στόχευση των λιπιδίων των εξωκυτταρίων κυστιδίων που μεσολαβούν στην πρόσληψή τους από τα κύτταρα στόχους,¹⁵⁰ και (γ) την αναστολή μετάδοσης του σήματος των υποδοχέων επιφανείας των εξωκυτταρίων κυστιδίων.^{151,152} Παράλληλα, στις μέρες μας τα εξωσώματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων. Επίσης δοκιμάζονται εμβόλια βασισμένα στα εξωσώματα. Τέλος, τα εξωσώματα που προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα βρίσκουν θεραπευτικές εφαρμογές στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής για αποκατάσταση των ιστών και οργάνων. Συνεπώς, οι εφαρμογές των εξωσωμάτων στην θεραπεία νοσημάτων συνοψίζονται στις παρακάτω: i) Θεραπευτική στόχευση των εξωσωμάτων, ii) χρήση εξωσωμάτων ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων σε κύτταρα στόχους που νοσούν, iii) ανάπτυξη εμβολίων με εξωσώματα προερχόμενα από φλεγμονώδη ή καρκινικά κύτταρα και iv) αποκατάσταση ιστών με

την χρήση εξωσωμάτων εκ βλαστικών κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική.

5.1 Τα εξωσώματα ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων σε κύτταρα στόχους

Τα πολυμερή νανοσωματίδια που αποτελούνται από πολυμερή καθώς και τα λιποσώματα μπορούν να ενσωματώσουν φαρμακευτικές ουσίες και για τον λόγο αυτό συχνά χρησιμοποιούνται για την χορήγηση αντι-ιικών, αντικαρκινικών και αντιμυκητιασικών φαρμάκων.¹⁵³ Όμως υπάρχουν κάποιες σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την συμβατότητα των νανοσωματιδίων και λιποσωμάτων με τον ζωντανό ιστό και το ενδεχόμενο επίθεσής τους στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή όταν χορηγούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.¹⁵³ Τα εξωσώματα έχουν ανάλογη δομή φωσφολιπιδίων με τα λιποσώματα και μπορούμε εύκολα να τα συλλέξουμε από τα διάφορα υγρά του ανθρωπίνου σώματος.¹⁵³ Όπως έχει περιγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία η χορήγηση φαρμάκων μέσω των εξωσωμάτων έχει αρκετά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων είναι τα παρακάτω: (α) το μικρό μέγεθος των εξωσωμάτων, (β) η μεγάλη ικανότητα των εξωσωμάτων να προκαλούν σύντηξη της πλασματικής μεμβράνης διαφορετικών κυττάρων και να διοχετεύουν το περιεχόμενό τους εντός αυτών, (γ) ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής των φαρμάκων που μεταφέρονται με εξωσώματα, (δ) η μεγάλη τάση των φαρμάκων που μεταφέρονται με τα εξωσώματα να συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή, (ε) η μεγάλη ειδικότητα των φαρμάκων που μεταφέρονται με τα εξωσώματα στα κύτταρα-στόχους, (στ) η βιοσυμβατότητα των εξωσωμάτων που μεταφέρουν φάρμακα χωρίς πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης, (ζ) η μεγάλη βιοαποδομησιμότητα των εξωσωματάτων ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων και (η) η μικρή τοξικότητα των εξωσωμάτων ως οχήματα παροχής φαρμάκων.^{26,154} Συνεπώς, τα εξωσώματα μπορούν λειτουργήσουν ως οχήματα μεταφοράς: 1) μικρών μορίων, 2) μεγάλων μορίων όπως πρωτεϊνών και πεπτιδίων, 3) μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNA) και 4) microRNA (miRNA).

5.1.1. Εξωσώματα ως οχήματα μεταφοράς μικρομοριακών φαρμάκων. Τα εξωσώματα καθότι έχουν μικρό μέγεθος χρησιμεύουν ως οχήματα μεταφοράς φαρμακευτικών μικρομοριακών ενώσεων και πλεονεκτούν στην χαμηλότερη τοξικότητα και βιοσυμβατότητα που επιδεικνύουν σε σχέση με τις προηγμένες μεθόδους χορήγησης με νανοφορείς, όπως είναι τα λιποσώματα και τα πολυμερή νανοσωματίδια.²⁶ Επίσης, τα εξωσώματα λόγω του μικρού τους μεγέθους λειτουργούν ως νανοσωματίδια που μπορούν να μεταφέρουν τα φάρμακα στους υποδοχείς των κυττάρων.²⁶ Έχει βρεθεί ότι τα εξωσώματα που περιείχαν δοξορουβικίνη έδειξαν καλύτερη *in vitro* ισχύ σε διάφορους τύπους κυττάρων και αυξημένη κυτταρική απορρόφηση και βιοκατανομή σε σύγκριση με την ελεύθερη δοξορουβικίνη.^{110,155} Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι εξωσώματα που περιείχαν την κουρκουμίνη, ανέστειλαν *in vitro* την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF), υποδηλώνοντας ότι τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν υδρόφοβα φάρμακα όπως είναι η κουρκουμίνη και να ενισχύσουν τα αντιφλεγμονώδη χαρακτηριστικά της.^{26,156} Ακόμα έχει βρεθεί ότι τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν φάρμακα μικρομοριακών ενώσεων διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) και να αυξήσουν τα θεραπευτικά χαρακτηριστικά των μικρομοριακών φαρμάκων που μεταφέρουν. Αυτή η ιδιότητα των εξωσωμάτων είναι πολύ σημαντική γιατί το 98% των φαρμάκων με κεντρική δράση δεν μπορούν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ακόμη τα περισσότερα νανοσκευάσματα που χρησιμοποιούνταν στις προηγμένες θεραπείες εμφανίζουν γρήγορη απορρόφηση και αποβολή του φαρμάκου από το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (mononuclear phagocyte system, MPS). Το πρόβλημα αυτό έγινε προσπάθεια να αντισταθμιστεί με την χορήγηση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), η οποία όμως μειώνει την απορρόφηση του φαρμάκου από το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (MPS) με αποτέλεσμα τη μειωμένη κατανομή του νανοφαρμάκου στον εγκέφαλο. Επίσης, τα νανο-φάρμακα που χρησιμοποιούνταν στις προηγμένες θεραπείες εμφανίζουν τοξικότητα στον οργανισμό.²⁶ Συνεπώς, τα εξωσώματα με ενσωματωμένα φάρμακα με μικρό

μοριακό βάρος είναι τα κατάλληλα οχήματα μεταφοράς για περάσουν αυτά τα φάρμακα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ασκήσουν την κεντρική τους δράση.^{154,157}

5.1.2. Εξωσώματα ως ιδανικά οχήματα μεταφοράς πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Τα εξωσώματα είναι ιδανικοί φορείς μεγάλων μορίων όπως πρωτεϊνών και πεπτιδίων.¹⁵⁸ Για παράδειγμα, έρευνα σε ασθενείς όπως η νόσος του Πάρκινσον έδειξε ότι τα εξωσώματα που περιέχουν την αντιοξειδωτική πρωτεΐνη καταλάση μεταφέρθηκαν αποτελεσματικά στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB), με αποτέλεσμα την βελτίωση της νόσου.¹⁵³ Ομοίως, ο Zhuang και συν πρότειναν ότι τα εξωσώματα στα οποία ενσωματώθηκε ο BAY55-9837 που είναι εκλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα του αγγειοδραστικού εντερικού πεπτιδίου 2 (vasoactive intestinal peptide 2, VPAC2) και χορηγήθηκαν με ένεση σε διαβητικούς ασθενείς μπόρεσαν να αυξήσουν σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης και να μειώσουν την υπεργλυκαιμία, υποδηλώνοντας μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική του ΣΔ2.^{159,160} Τα τροποποιημένα εξωσώματα με τον παράγοντα BAY55-9837 (BAY-exosome-SPION) στοχεύουν και συσσωματώνονται στην επιφάνεια των β-κυττάρων του παγκρέατος υπό τη δράση μιας μαγνητικής δύναμης και το απελευθερωμένο BAY55-9837 συνδέεται με τους υποδοχείς VPAC2 στα β-κύτταρα ώστε να ενισχύσει την έκκριση ινσουλίνης.¹⁶¹

5.1.3. Εξωσώματα ως οχήματα μεταφοράς μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNA). Το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για γονιδιακή σίγαση και θεραπευτικές εφαρμογές. Το siRNA είναι ένα εξωγενές δίκλωνο RNA που προσδένεται στο mRNA στόχο στις γενετικές θεραπείες και καταστέλλει την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου.²⁴ Όμως το siRNA έχει περιορισμένη σταθερότητα και αλλοιώνεται στη συστηματική κυκλοφορία.²⁶ Συνεπώς, μια από τις κύριες προκλήσεις στη φαρμακολογία του siRNA είναι η αποτελεσματική παράδοση των μορίων siRNA στα κύτταρα στόχους. Οι τρέχουσες μέθοδοι μεταφοράς φαρμάκων όπως τα νανοσωματίδια λιπιδίων, οι ιικοί φορείς και τα συζεύγματα έχουν περιορισμούς

όσον αφορά την σταθερότητα, ειδικότητα, ανοσογονικότητα και τοξικότητα.²⁶ Μια από τις νέες μεθόδους χορήγησης siRNA στην φαρμακολογία είναι η χρήση των εξωσωμάτων. Η χορήγηση siRNA με εξωσώματα ως φορείς στηρίζεται στα πολλά πλεονεκτήματα που έχουν τα εξωσώματα όπως την ικανότητά τους να διασχίζουν βιολογικούς φραγμούς προκειμένου να παραδώσουν το φορτίο τους στα κύτταρα αποδέκτες, την αποφυγή ανοσολογικής αναγνώρισης και ανοσο-απόκρισης και την αποφυγή αποικοδόμησης από ένζυμα του ορού.^{26,162-164} Οι ερευνητές Alvarez-Erviti και συν. (2011) κατέδειξαν ότι τα εξωσώματα που απομονώθηκαν από δενδριτικά κύτταρα και στα οποία ενσωματώθηκαν μόρια siRNA μπόρεσαν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε φυσιολογικό τύπο ποντικών (wild type) στοχεύοντας τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου και καταστέλλοντας σε ποσοστό 60% την πρωτεΐνη-στόχο BACE1 ως θεραπευτικό στόχο της νόσου του Alzheimer εμφανίζοντας μειωμένη τοξικότητα.¹⁶⁵

5.1.4. Εξωσώματα ως φορείς microRNA (miRNA). Τα miRNA είναι μονόκλωνα μικρά ενδογενή μόρια RNA με μήκος 20 έως 22 νουκλεοτίδια, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες.^{166,167} Τα miRNA ρυθμίζουν αρνητικά την γονιδιακή έκφραση με πρόσδεσή τους σε συμπληρωματικές θέσεις στο στοχευμένο mRNA προκαλώντας είτε αποικοδόμηση των μεταγράφων, είτε καταστολή της μετάφρασης.^{166,168} Επειδή τα εξωσώματα μεταφέρουν φυσικά miRNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οχήματα μεταφοράς του miRNA σε επιλεγμένα κύτταρα για θεραπευτικούς σκοπούς.¹⁶⁹ Για παράδειγμα, οι ερευνητές Ohno και συνεργάτες διεξήγαγαν μια μελέτη στην οποία απομόνωσαν εξωσώματα από ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα (HEK293) και τα φόρτωσαν με το συνθετικό miRNA-Let7a που στόχευε τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

που εκφραζόταν στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.¹⁰⁸ Στην συνέχεια έκαναν ένεση των τροποποιημένων εξωσωμάτων με το miRNA-Let7a σε RAG2-/- ποντίκια και παρακολούθησαν την ανάπτυξη του όγκου μαστού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταφορά εξωσωματος-miRNA-Let7a κατέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου μαστού που εξέφραζε τον EGFR.¹⁰⁸

6. Συμπεράσματα

Τα εξωσώματα έχουν την ικανότητα να επιτυγχάνουν την διανομή βιοδραστικών συστατικών σε κύτταρα στόχους και έτσι αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στην κυτταρική θεραπεία διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών, των ανοσολογικών, των νευρολογικών, των δερματολογικών παθήσεων καθώς και των κακοηθειών. Μεγάλη κλινική σημασία έχει το γεγονός ότι τα εξωσώματα έχουν την φυσική ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μεταφέρουν με μακροπρόθεσμη ασφάλεια διακυτταρικώς νουκλεϊνικά οξέα και θεραπευτικά μόρια για την αντιμετώπιση των νοσημάτων του ανθρώπου. Επίσης, τα εξωσώματα είναι βιοσυμβατά, βιοαποδομήσιμα και λιγότερο τοξικά συγκριτικά με άλλα συστήματα χορήγησης νανοσωματιδίων, όπως είναι τα λιπосώματα και τα πολυμερή νανοσωματίδια και προστατεύουν τα νουκλεϊκά οξέα από τα ενδοσωμικά και τα λυσοσωμικά μονοπάτια υποβάθμισης. Επιπρόσθετα, τα εξωσώματα χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία, την ανάπτυξη εμβολίων και την αναγεννητική ιατρική. Όμως παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα των εξωσωμάτων υπάρχουν πολλές προκλήσεις στην κατανόηση των εξωσωμάτων προτού αυτά τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων γίνουν αποδεκτά στην κλινική θεραπευτική ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων. □

Exosomes as Biomarkers and Therapeutic Drug Delivery Vehicles across Biological Membranes for Various Human Diseases

Varra Fani-Niki^{1,2}, Varra Victoria-Konstantina³, Varras Michail^{4*}

^{1,2}Department of Medicine, Democritus University of Trace, 68100 Alexandroupoli, Greece

²Department of Pharmacy, Scholl of Health Sciences, Frederick University, Nicosia 1036, Cyprus

³Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, Patras 26504, Greece,

⁴Fourth Department of Obstetrics and Gynecology, "Elena Venizelou" General Hospital, Elena Venizelou Square 2, Ampelokipoi, 11521 Athens, Greece

KEY WORDS:

*Extracellular vesicles;
Exosomes; Biological
Functions; Nanocarrier;
Drug Delivery Systems*

ABSTRACT

Exosomes are nanovesicles composed of bilayer membranes that are involved in various physiological and pathological biological processes and can easily cross the blood-brain barrier. The use of exosomes as drug delivery vehicles offers significant advantages compared to other nanoparticle delivery systems such as liposomes and polymeric nanoparticles. The advantages of exosomes over liposomes and polymers in drug delivery are due to a) the small size of exosomes, b) the great ability of exosomes to cause fusion of the plasma membrane of various cell types and to provide their contents inside the cells, c) the long half-life of the transported drugs by the exosomes, d) the high tendency of the transported drugs to accumulate in cancer cells compared to healthy ones, e) the high specificity of the transported drugs with the exosomes in the target cells, f) the biocompatibility of the exosomes that transport drugs without inducing an immune reaction, g) the high biodegradability of exosomes as drug delivery vehicles, g) the low toxicity of exosomes as drug delivery vehicles and h) the non-accumulation of exosomes in the liver and the avoidance of the first-pass metabolism. This article describes in detail the origin, cargo and characteristics of exosomes, their role as diagnostic and prognostic biomarkers and their clinical significance as therapeutic delivery systems of 1) small molecules, 2) large molecules such as proteins and peptides, 3) small interfering RNA molecules (siRNA) and 4) microRNA (miRNA) for the treatment of various human diseases. In conclusion, the various components of exosomes, their functional properties and their role as biomarkers should be fully understood before these drug delivery systems become the new therapeutic reality.

* CORRESPONDING

AUTHOR:

Dr. Michail Varras,
Email: mnvarras@otenet.gr

Βιβλιογραφία:

1. Borges F.T., Reis L.A., Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 824-830, 2013.
2. Urbanelli L., Magini A., Buratta S., Brozzi A., Sagini K., Polch A., ET AL. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes* 4, 152-170, 2013.
3. Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P. Extracellular vesicles: Composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience* 65, 783-797, 2015.
4. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol. Life Sci.* 75, 193-208, 2018.
5. Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J., ET AL. Reassessment of exosome composition. *Cell* 177, 428-445.e18, 2019.
6. Boukouris S., Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin. Appl.* 9, 358-367, 2015.
7. Qin J., Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol. Pharm.* 71, 537-543, 2014.
8. Tukmechi A., Rezaee J., Nejati V., Sheikhzaden N. Effect of acute and chronic toxicity of paraquat on immune system and growth performance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Res.* 45, 1737-1743, 2014.
9. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., James V., Rizvanou A.A., Solovyeva V.V. Therapeutic properties of extracellular vesicles in cancer treatment. *Front. Immunol.* 9, 1534, 2018.
10. Sun Y.-Z., Ruan J.-S., Jiang Z.-S., Wang L., Wang S.-M. Extracellular vesicles: a new perspective in tumor therapy. *BioMed. Res. Int.* 2018, 2687954, 2018.
11. Gurunathan S., Kang M.-H., Jeyaraj M., Qasim M., Kim J.-H. Review of the isolation, characterization, biological function, and multiarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells* 8, 307, 2019.
12. Soraya H., Sani N.A., Jabbari N., Rezaie J. Metformin increases exosome biogenesis and secretion of U87 MG human glioblastoma cells: a possible mechanism of therapeutic resistance. *Arch. Med. Res.* 52, 151-162, 2021.
13. Feghhi M., Rezaie J., Akbari A., Jabbari N., Jarari H., Seidi F., Szafert S. Effect of multi-functional polyhydroxylated polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) nanoparticles on the angiogenesis and exosome biogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Mater. Des.* 197, 109227, 2021.
14. Rezaie J., Feghhi M., Etemdi T. A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges. *Cell Commun. Signal.* 20, 145, 2022.
15. Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neuro-Oncol.* 113, 1-11, 2013.
16. Patil A.A., Phee W.J. Exosomes: biogenesis, composition, functions, and their role in pre-metastatic niche formation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 24, 689-701, 2019.
17. Kalluri R., Lebleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367, eaau6977, 2020.
18. Teng F., Fussenegger M. Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering. *Adv. Sci. (Weinh.)* 8, 2003505, 2021.
19. Buschmann D., Mussack V., Byrd J.B. Separation, characterization, and standarization of extracellular vesicles from drug delivery applications. *Adv. Drug Deliv.* 174, 348-368, 2021.
20. Tarasov V.V., Svistunov A.A., Chubarev V.N., Dostdar S.A., Sokolov A.V., Brecka A., et al. Extracellular vesicles in cancer nanomedicine. *Semin. Cancer Biol.* 69, 212-225, 2021.
21. Choi J.-Y., Kim S., Kwak H.-B., Park D.-H., Kark J.-H., Ryu J.-S. Extracellular vesicles as a source of urological biomarkers: Lessons learned from advnaces and challenges in clinical applications to major diseases. *Int. Neurourol. J.* 21, 83-96, 2017.

22. Butler J.T., Abdelhamed S., Kurre P. Extracellular vesicles in the hematopoietic microenvironment. *Haematologica* 103, 382-394, 2018.
23. Liu M., Sun Y., Zhang Q. Emerging role of extracellular vesicles in bone remodeling. *J Dent Res* 97, 859-868, 2018.
24. Jurj A., Zanoaga O., Braicu C., Lazar V., Tomulease C., Irimie A., et al. A comprehensive picture of extracellular vesicles and their contents. Molecular transfer to cancer cells. *Cancer* 1, 298, 2020.
25. Colombo M., Moita C., Van Niel G., Kowal J., Vignero J., Benaroch P., et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 126, 5553-5565, 2013.
26. Rajput A., Varhney A., Bajaj R., Pokharkar V. Exosomes as new generation vehicles for drug delivery: Biomedical Applications and Future Perspectives. *Molecules* 27, 7289, 2022.
27. Soung Y.H., NGUYEN T, CAO H, LEE J, CHUNG J. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep.* 49, 18, 2016.
28. Abdayzdani N., Nourazarian A., Charoudeh H.N., Kazimi M., Feizy N., Akbarzade M., et al. The role of morphine on rat neural stem cells viability, neuro-angiogenesis and neuro-steroidogenesis properties. *Neurosci. Lett.* 636, 205-212, 2017.
29. Blanc L., Vidal M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* 9, 95-106, 2018.
30. Hassanpour M., Rezaie J., Darabi M., Hiradfar A., Rahbarghazi R., Nouri M. Autophagy modulation altered differentiation capacity of CD146+ cells toward endothelial cells, pericytes, and cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* 11, 1-14, 2020.
31. Xu J., Camfield R., Gorski S.M. The interplay between exosomes and autophagy-partners in crime. *J. Cell Sci.* 131, jcs215210, 2018.
32. Xing H., Tan J., Miao Y., Lv Y., Zhang Q. Crosstalk between exosomes and autophagy: a review of molecular mechanisms and therapies. *J. Cell Mol. Med.* 25, 2297-2308, 2021.
33. Yuan D., Zhao Y, Banks W.A., Bullock K.M., Haney M., Batrakova E., Kabanov A.V. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials* 142, 1-12, 2017.
34. Van Niel G., Porto-Carreilo I., Simoes S., Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140, 13-21, 2006.
35. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2200, 373-383, 2013.
36. Dominkuš P.P., Stenovec M., Sitar S., Lasič E., Zorec R., Plemenitaš A., et al. PKH26 labeling of extracellular vesicles. Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Biomembr.* 1860, 1350-1361, 2018.
37. Jankovičová J., Sečová P., Michalková K., Antalíková J. Tetraspanins, more than markers of extracellular vesicles in reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7568, 2020.
38. Gurung S., Perocheau D., Touramanidou L., Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun. Signal.* 19, 47 2021.
39. Yellon D.M., Davidson S.M. Exosomes. *Circ. Res.* 114, 325-332, 2014.
40. Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y.-J., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* 2, 180, 2011.
41. Thakur B.K., Zgang H., Becker A., Matei I., Huang Y., Costa-Silva B., et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 24, 766-769, 2014.
42. Sansone P., Savini C., Kurelac I., Chang Q., Amato L.B., Strillacci A., et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 114, E9066-e9075, 2017.
43. Μαστρογεωργίου Μ. Εξωσώματα και ρινοφαρυγγικός καρκίνος. (Ανέκδοτη πτυχιακή εργασία). Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα,

- Ελλάδα, 2023.
44. Pegtel D.M., Gould S.J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 487-514, 2019.
 45. Shurtleff M., Yao J., Qin Y., Nottingham R.M., Temoché-Diaz M.M., Schekman R., et al. Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 114(43), p. E8987-e8995, 2017.
 46. Yáñez-Mó M., Siljander P.R.-M., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4, 10.3402/jev.v4.27066, 2015.
 47. Zhang H.-G., Liu C., Su K., Yu K., Yu S., Zhang L., et al. A Membrane Form of TNF- α Presented by Exosomes Delays T Cell Activation-Induced Cell Death. *J. Immunol.* 176, 7385-7393, 2006.
 48. Sitia R., Rubartelli A. Evolution, role in inflammation, and redox control of leaderless secretory proteins. *J. Biol. Chem.* 295, 7799-7811, 2020.
 49. Murphy C., Withrow J., Hunter M., Liu Y, Tang Y.L., Lulzele S., et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Mol. Aspects Med.* 60, 123-128, 2018.
 50. Cyrpyk W., Nyman T.A., Matikainen S. From inflammasome to exosome – does extracellular vesicles secretion contribute an inflammasome-dependent immune response? *Front. Immunol.* 9, 2188, 2018.
 51. Teixeira G.Q., Pereira C.L., Ferreira J.R., Maia A.F., Gomez-Lazaro M., Barbosa M.A., et al. Immunomodulation of human mesenchymal stem/stromal cells in intervertebral disc degeneration: Insights from a proinflammatory/degenerative ex vivo model. *Spine (Phila Pa 1976)* 43, E673-E682, 2018.
 52. Ranson N., Veldhuis M., Mitchell B., Fanning S., Cook A.L., Kunde D., et al. NLRP3-Dependent and independent processing of interleukin (IL)-1 β in active ulcerative colitis. *Inter. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 57, 2019.
 53. Scotland T., Sandvir K., Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* 66, 30-41, 2017.
 54. Dillon S.R., Mancini M., Rosen A., Schlissel M.S. Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. *J. Immunol.* 164, 1322-1332, 2000.
 55. Gender P.P., Cabrini M., Jancic C., Paoletti L., Banchio C., Von Bilderling C., et al. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 209, 435-52, 2015.
 56. Μωυσίδης Σ. Βλαστοκύτταρα και αναγεννητική ιατρική. (Ανέκδοτη πτυχιακή εργασία). Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, 2023.
 57. Xu J., Liao K., Zhou W. Exosomes regulate the transformation of cancer cells in cancer stem cell homeostasis. *Stem Cells Int* 2018, 4837370, 2018.
 58. Segura E., Nicco C., Lombard B., Véron P., Raroso G., Batteux F., et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106, 216-223, 2005.
 59. Milane L., Singh A., Matheolabakis G., Suresh M., Amiji M.M. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J. Control. Release* 219, 278-294, 2015.
 60. Chen I.H., Xue L., Hsu C.C., Paez J.S., Pan L., Andaluz H., et al. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 3175-3180, 2017.
 61. Mahmoudi M., Taghavi Farahabadi M., Hashemi S.M. Exosomes: Mediators of Immune Regulation. *Immunoreg.* 2, 3-8, 2019.
 62. Kato T., Fahrman J.F., Hanash S.M., Vykoukal J. Extracellular vesicles mediate B cell immune response and are a potential target for cancer therapy. *Cell* 9, 1518, 2020.
 63. Bhatnager S., Schorey J.S. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J. Biol. Chem.* 282, 25779-89, 2007.
 64. Robbins P.D., Dorronsoro A., Booker C.N. Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *J. Clin. Invest.* 126, 1173-1180, 2016.
 65. Liu Y., Holmes C. Tissue regeneration capacity of extracellular vesicles isolated from bone

- marrow-derived and adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 648098, 2021.
66. McGough I.J., Vincent J.-P. Exosomes in developmental signalling. *Development* 2016, 143:2482-2493.
 67. Wu H.-M., Chen L.-H., Hsu L.-T., Lai C.-H. Immune tolerance of embryo implantation and pregnancy: The role of human decidual stromal cell- and embryonic-derived extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13382, 2022.
 68. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Lim S.K. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front. Immunol.* 5, 518, 2014.
 69. Hedlund M., Stenqvist A.-C., Nagaeva O., Kjellberg L., Wulff M., Baranov V., et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J. Immunol.* 183, 340-351, 2009.
 70. Lundholm M., Schröder M., Magaeva O., Baranov V., Widmark A., Mincheva-Nilsson L., Wikström P. Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression of natural killer cells and CD8+ T cells: Mechanism of immune evasion. *PLoS One* 9, 3108925, 2014.
 71. Morelli A.E., Sadovsky Y. Extracellular vesicles and immune response during pregnancy: A balancing act. *Immunol. Rev.* 308, 105-122, 2022.
 72. Qu P., Qing S., Liu R., Qin H., Wang W., Qiao F, et al. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *BLos One* 12, e0174535, 2017.
 73. Raab-Traub N., Dittmer D.P. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 559-572, 2017.
 74. Hu Y., Rao S.-S., Wang Z.-X., Cao J., Tan Y.-J., Luo J., et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* 8, 169-184, 2018.
 75. Lener T., Gimona M., Aigner L., Börger V., Buzas E., Camussi G., et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – An ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* 4, 30087, 2015.
 76. Ngolab J., Trinh I., Rockenstein E., Mante M., Florio J., Trejo M, et al. Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate α -synuclein pathology. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 1-10, 2017.
 77. Pusic A.D., Kraig R.P. Youth and Environmental Enrichment Generate Serum Exosomes Containing miR-219 that Promote CNS Myelination. *Glia* 62, 284-299, 2014.
 78. Cai Z.-Y., Xiao M., Quazi S.H., Ke Z.-Y. Exosomes: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease? *Neural. Regen. Res.* 13, 930-935, 2018.
 79. Li J.-Y., Li Q.-Q., Sheng R. The role and therapeutic potential of exosomes in ischemic stroke. *Neurochem. Int.* 151, 105194, 2021.
 80. Ramkrishnaiah V., Thumann C., Fofana I., Habersetzer F., Pan Q., De Rutter P.E., et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 13109-13113, 2013.
 81. Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J., Singh S., Zhang H., Thakur B.K., et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17, 816-826, 2015.
 82. Melo S.A., Sugimoto H., O'Connell J.T., Kato N., Villanueva A., Vidal A., et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707-721, 2014.
 83. Fiandaca M.S., Kapogiannis D., Mapstone M., Boxer A., Eitan E., Schwartz J.B., et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neural derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's Dement.* 11, 600-607.e1, 2015.
 84. Cappello F., Logozzi M., Campanella C., Bavisotto C.C., Marcilla A., Properzi F., et al. Exosomes levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? *Eur. J. Pharm. Sci.* 96, 93-98, 2017.
 85. Mendt M., Rezvani K., Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use.

- Bone Marrow Transplant 54, 789-792, 2019.
86. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 582-598, 2016.
87. Varra F.N., Varras M., Varra V.K., Theodosios-Nobelos P. Molecular and pathophysiological relationship between obesity and chronic inflammation in the manifestation of metabolic dysfunction and their inflammation-mediating treatment options (Review). *Mol. Med. Rep.* 29, 95, 2024.
88. Varra F.-N., Gkouzgos S., Varras M., Theodosios-Nobelos P. Efficacy of antioxidant compounds in obesity and its associated comorbidities. *Pharmakeftiki* 36, 2-19, 2024.
89. Ji C., Guo X. The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 731-743, 2019.
90. Kumar, A.; Sundaram, K.; Mu, J.; Dryden, G.W.; Sriwastva, M.K.; Lei, C.; Zhang, L.; Qiu, X.; Xu, F.; Yan, J. High-fat diet-induced upregulation of exosomal phosphatidylcholine contributes to insulin resistance. *Nat. Commun.* 12, 213, 2021.
91. Wang, W.; Zhu, N.; Yan, T.; Shi, Y.-N.; Chen, J.; Zhang, C.-J.; Xie, X.-J.; Liao, D.-F.; Qin, L. The crosstalk: Exosomes and lipid metabolism. *Cell Commun Signal* 18, 119, 2020.
92. Safdar A., Saleem A., Tarnopolsky M.A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 504-517, 2016.
93. Guay C, Regazzi R. New emerging tasks for microRNAs in the control of beta-cell activities. *Biochim Biophys Acta* 1861, 2121-2129, 2016.
94. Nesca V., Guay C., Jacovetti C., Menoud V., Peyot M.-L., Laybutt D.R., et al. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia* 56, 2203-2212, 2013.
95. Eliasson L., Esguerra J.L. Role of non-coding RNAs in pancreatic beta-cell development and physiology. *Acta Physiol. (Oxf.)* 211, 273-284, 2014.
96. Wang N, Li J, Hu Z, Ngowi EE, Yan B, Qiao A. Exosomes: New insights into the pathogenesis of metabolic syndrome. *Biology* 12, 1480, 2013.
97. O'Neil S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* 16, 1-12, 2015.
98. Ying W, Riopel M., Bandyopadhyay G., Dong Y, Birmingham A., Seo J.B., et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate *in vivo* and *in vitro* insulin sensitivity. *Cell* 171, 372-384.e12, 2017.
99. Dang S.-Y., Leng Y., Wang Z.-X., Xiao X., Zhang X., When T., et al. Exosomal transfer of obesity adipose tissue for decreased miR-141-3p mediate insulin resistance of hepatocytes. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 351, 2019.
100. Mao Z.-J., Weng S.-Y., Lin M., Chai K.-F. Yunpi Heluo decoction attenuates insulin resistance by regulating liver miR-29a-3p in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.* 243, 111966, 2019.
101. Su T, Xiao Y, Xiao Y, Guo Q, Li C., Huang Y., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal MiR-29b-3p regulates aging-associated insulin resistance. *ACS Nano.* 13, 2450-2462, 2019.
102. Al-Kafaji G., Al-Mahtareh H.A., Salem A.H. Expression and clinical significance of miR-1 and mirR-133 in pre-diabetes. *Biome. Rep.* 14, 33, 2021.
103. Wang Y, Li M, Chen L, Bian H, Chen X, Zheng H, et al. Natural killer cell-derived exosomal miR-1249-3p attenuates insulin resistance and inflammation in mouse models of type 2 diabetes. *Signal. Transduct. Target Ther.* 6, 409, 2021.
104. Properzi F, Logozzi M., Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Bomark. Med.* 7, 769-778, 2013.
105. Nadaeina R., Manian M., Jazayeri M., Ranjar M., Salehi R., Sharifi M., et al. Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Ther.* 24, 48-56, 2017.
106. Macías M., Alegre E., Díaz-Lagares A, Patiño A. Pérez-Gracia J., Sannamed M., et al. Liquid biopsy: from basic research to clinical practice. *Adv.*

- Clin. Chem.* 83, 73–119, 2018.
107. ZHOU B, XU K, ZHENG X, CHEN T, WANG J, SONG Y, ET AL. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct. Target Ther.* 5, 1-14, 2020.
 108. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, ET AL. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol. Ther.* 21, 185-191, 2013.
 109. Steinbichler T.B., Dudás J., Riechelman H., Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 44, 170-181, 2017.
 110. Tian Y., Li S., Song J., Ji T., Zhu M., Anderson G.J., et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 35, 2383–2390, 2014.
 111. Κούλη Π. Εξωσώματα και καρκίνος του πνεύμονα. (Ανέκδοτη πτυχιακή εργασία). Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα, 2021.
 112. Wang X., Tian L., Lu J., Oi-Lin Ng I. Exosomes and cancer – Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle. *Oncogenesis* 11, 54, 2022.
 113. Melo S.A., Luecke L.B., Kahlert C., Fernandez A.F., Gammon S., Kaye J., et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177–182, 2015.
 114. Bijnsdord I.V., Geldof A.A., Lavaei M., Piersma S.R., Van Moorselaar J.A., Jimenez C.R. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J. Extracell. Vesicles* 2, 1–10, 2013.
 115. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T.-L., Rodrigues G., Hashimoto A., Mark M.T., et al. Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329-335, 2015.
 116. Sandfeld-Paulsen B., Jakobsen K.R., Bæk R., Folkersen B.H., Rasmussen T.R., Meldgaard P., et al. Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1701–1710, 2016.
 117. Maji S., Chaudhary P., Akopova I., Nguyen P.M., Hare R.J., Gryczynski I., et al. Exosomal annexin II promotes angiogenesis and breast cancer metastasis. *Mol. Cancer Res.* 15, 93–105, 2017.
 118. Baker S.G., Kramer B.S., McIntosh M., Patterson B.H., Shyr Y., Skates S. Evaluating markers for the early detection of cancer: overview of study designs and methods. *Clin. Trials* 3, 43-56, 2006.
 119. Alleson K., Castillo J., San Lucan F.A., Scelo G., Kim D.U., Bernard V., et al. High prevalence of mutant *KRAS* in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann. Oncol.* 28, 741-747, 2017.
 120. Bernard V., Kim D.U., San Lucas F.A., Castillo J., Allenson K., Mulu F.C., et al. Circulating nucleic acids associate with outcomes of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 156, 108–118, 2019.
 121. Lux A., Kahlert C., Grützmann R., Pilarsky C. c-Met and PD-L1 on circulating exosomes as diagnostic and prognostic markers for pancreatic cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3305, 2019.
 122. Castellanos-Rizaldos E., Grimm D.G., Tadigotla V., Hurley J., Healy J., Neal P.L., et al. Exosome-based detection of EGFR T790M in plasma from non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 24, 2944–2950, 2018.
 123. Qu L., Ding J., Chen C., Wu Z.-J., Liu B., Gao Y., et al. Exosome-transmitted lncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA. *Cancer Cell* 29, 653–668, 2016.
 124. Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., et al. microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J. Thor. Oncol.* 8, 1156-1162, 2013.
 125. Tanaka Y., Kamohara H., Kinoshita K., Kurashige J., Ishimoto T., Iwatsuki M., et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119, 1159-1167, 2013.
 126. Armstrong D.A., Green B.B., Seigne J.D., Schned A.R., Marsit C.J. MicroRNA molecular profiling

- from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Mol. Cancer* 14, 194, 2015.
127. Bu H., He D., He X., Wang K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *Chembiochem.* 20, 451-461, 2019.
 128. Zeng Z., Li Y., Pan Y., Lan X., Song F., Sun J., et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat. Commun.* 9, 5395, 2018.
 129. Meltzer S., Bjørnetø T., Lyckander L.G., Flatmark K., Duelad S., Samiappan R., Johansen C., Kalanzhi E., Ree A.H., Redalen K.R. Circulating exosomal miR-141-3p and miR-375 in metastatic progression of rectal cancer. *Transl. Oncol.* 12, 1038-1044, 2019.
 130. Hu J.L., Wang W., Lan X.L., Zeng Z.C., Liang Y.S., Yan Y.R., et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol. Cancer* 18, 91, 2019.
 131. Shao Y., Chen T., Zheng X., Yang S., Xu K., Chen X., et al. Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis* 2018, 39:1368-1379.
 132. Fu F., Jiang W., Zhou L., Chen Z. Circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p predict pathologic stage and grade of colorectal cancer. *Transl. Oncol.* 11, 221-232, 2018.
 133. Peng Z.Y., Gu R.H., Yan B. Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J. Cell. Biochem.* 120, 1457-1463, 2018.
 134. Wei F., Ma C., Zhou T., Dong X., Luo Q., Geng L., et al. Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Mol. Cancer* 16, 132, 2017.
 135. Ghafarian F., Pashirzad M., Khazaei M., Rezayi M., Hassanian S.M., Ferns G.A., et al. The clinical impact of exosomes in cardiovascular disorders: from basic science to clinical application. *J. Cell. Physiol.* 234, 12226-12236, 2019.
 136. Howard B.V., Robbins D.C., Sievers L., Lee E.T., Rhoades D., Devereux R.B., et al. LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL: The Strong Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 830-835, 2000.
 137. Ndrepera G., Collieran R., Braun S., Cassese Hieber J., Fusano M., Kunfner S., et al. High-sensitivity troponin T and mortality after elective percutaneous coronary intervention. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2259-2268, 2016.
 138. Kuwabara Y., Ono K., Horie T., Nishi H., Nagao K., Kinoshita M., et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 446-454, 2011.
 139. Goren Y., Kushnir M., Zafrir B., Tabak S., Lewis B.S., Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 14, 147-154, 2012.
 140. Matsumoto S., Sakata Y., Suna S., Nakatani D., Usami M., Hara M., et al. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 113, 322-326, 2013.
 141. Barile L., Lionetti V., Cervio E., Matteucci M., Gherghiceanu M., Popescu L.M., et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 103, 530-541, 2014.
 142. Liu Y., Li Q., Hosen M.R., Zietzer A., Llender A., Levermann P., Schimitz T., Frühwald D., Goody P., Nickenig G., Werner N., Jansen F. Atherosclerotic conditions promote the packaging of functional microRNA-92a-3p into endothelial microvesicles. *Circ. Res.* 124, 575-587, 2019.
 143. Li, H. Liao Y., Gao L., Zhuang T., Huang Z., Zhu H., Ge J. Coronary serum exosomes derived from patients with myocardial ischemia regulate angiogenesis through the miR-939-mediated nitric oxide signaling pathway. *Theranostics* 8, 2079-2093, 2018.

144. Kanhai D., Visseren F.L.J., Van Der Graaf Y., Schoneveld A.H., Catanzariti L.M., Timmers L., et al. Microvesicle protein levels are associated with increased risk for future vascular events and mortality in patients with clinically manifest vascular disease. *Int. J. Cardiol.* 168, 2358-2363, 2013.
145. Bezerin A.E., Kremzer A.A., Martovitskaya Y.V., Berezina T.A., Gromenko E.A. Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction. *EBio-Medicine* 20, 86-94, 2016.
146. Crivelli S.M., Giovagnoni C., Zhu Z., Tripathi P., Elsherbini A., Quadri Z., et al. Function of ceramide transfer protein for biogenesis and sphingolipid composition of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 11, e12233, 2022.
147. Catalano M., O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J. Extracell. Vesicles* 9, 1703244, 2020.
148. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. Extracellular vesicles and nanoparicles: emerging complexities. *Trends Cell Biol.* 33, 667-681, 2023.
149. Liu Q., Li D., Pan X., Liang Y. Targeted therapy using engineered extracellular vesicles: principles and strategies for membrane modification. *J. Nanobiotechnology* 21, 334, 2023.
150. Ghadami S., Dellinger K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostic and therapeutic delivery. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1198044, 2023.
151. Teixeira A.F., Wang Y., Iaria J., Ten Dijke P., Zhu J.-J. Simultaneously targeting extracellular vesicle trafficking and TGF- β receptor kinase activity blocks signaling hyperactivation and metastasis. *Signal Transduct. Target Ther.* 8, 456, 2023.
152. Papareddy P., Tapken I., Kroh K., Varma Bhongir R.K., Rahman M., Baumgarten M., et al. The role of extracellular vesicle fusion with target cells in triggering systemic inflammation. *Nat. Commun.* 15, 1150, 2024.
153. Mehanny M., Lehr C.-M., Fuhrann G. Extracellular vesicles as antigen carriers for novel vaccination avenues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 173, 164-180, 2021.
154. Dad H.A., Gu T.-W., Zhu A.-Q., Huang L.-Q., Peng L.-H. Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplat-forms. *Mol. Ther.* 29, 13-31, 2021.
155. Kim, G.; Lee, Y.; Ha, J.; Han, S.; Lee, M. Engineering exosomes for pulmonary delivery of peptides and drugs to inflammatory lung cells by inhalation. *J. Control. Release* 330, 684-695, 2021.
156. Chinnappan M., Srivastava A., Amreddy N., Razaq M., Pareek V., Almed R., et al. Exosomes as drug delivery vehicle and contributor of resistance to anticancer drug. *Cancer Lett.* 486, 18-28, 2020.
157. Patil S.M., Sawant S.S., Kunda N.K. Exosomes as drug delivery systems: a brief overview and progress update. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 154:259-269, 2020.
158. Kar R., Dhar R., Mukherjee S., Nag S., Gorai S., Mukerjee N., et al. Exosome-based smart drug delivery tool for cancer theranostics. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 9, 577-594, 2023.
159. Zhuang M., Du D., Pu L., Song H., Deng M., Long Q., et al. SPION-decorated exosome delivered BAY55-9837 targeting the pancreas through magnetism to improve the blood GLC response. *Small* 15, 1903135, 2019.
160. Zhuang M., Rao L., Chen Y., Xiao S., Xia H., Yang J., et al. Controlled SPION-exosomes loaded with quercetin preserves pancreatic beta cell survival and function in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Nanomedicine* 18, 5733-5748, 2023.
161. Hou X., Yang D., Yang G., Li M., Zhang J. Therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide and its receptor VPAC2 in type 2 diabetes. *Front. Endocrinol.* 13, 984198, 2022.
162. Butreddy A., Kommineni N., Duphipala N. Exosomes as naturally occurring vehicles for deliver of biopharmaceuticals: Insights from drug delivery to clinica perspectives. *Nanomaterials (Basel)* 11, 1481, 2021.

163. Zeng H., Guo S., Ren X., Wu Z., Liu S., Yao X. Current strategies for exosomes cargo loading and targeting delivery. *Cell* 12, 1416, 2023.
164. Lu Y., Huang W., Li M., Zheng A. Exosome-based carrier for DNA delivery: progress and challenges. *Pharmaceutics* 15, 598, 2023.
165. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhali S., Wood M.J.A. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29, 341–345, 2011.
166. Bartel D.P. MicroRNAs: genomic, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116, 281-297, 2004.
167. Τροχάτου Ο. Μελέτη του ρόλου των microRNAs στη ρύθμιση των μηχανισμών αυτοανάνεωσης και διαφοροποίησης των μεσεκχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού. Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα, 2013.
168. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233, 2009.
169. Ha, D.; Yang, N.; Nadithe, V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: Current perspectives and future challenges. *Acta Pharm. Sin. B* 6, 287–296, 2016.