

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΩΣ ΡΥΘΟΜΙΣΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΞΕΝΙΣΤΗ-
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ**

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΤ. ΧΑΤΖΗΔΑΚΗΣ

A.M. 19678334

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2025

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCE

DIVISION: MEDICAL LABORATORIES



BACHELOR DEGREE THESIS

USE OF EXOSOMES IN FISH AS REGULATORS IN HOST-PATHOGEN INTERACTION

EMMANOUIL ST. CHATZIDAKIS

REGISTRATION NUMBER: 19678334

SUPERVISOR PROFESSOR: EFSTATHIOU ANTONIA

ATHENS 2025

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

	ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΞΕΤΑΣΤΩΝ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Ευσταθίου Αντωνία	
2^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Μπελούκας Απόστολος	
3^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Βογιατζάκη Χρυσάνθη	

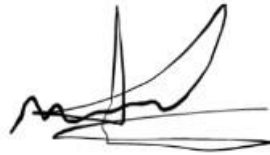
Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Χατζηδάκης Εμμανουήλ του Στυλιανού, με αριθμό μητρώου 19678334μφοιτητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

"Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της πτυχιακής μου μέχρι 6 μήνες και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή."

Υπογραφή Φοιτητή
(Χατζηδάκης Εμμανουήλ)



Υπογραφή Επιβλέποντα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Αντωνία Ευσταθίου για την σημαντική καθοδήγησή και τις συμβουλές της καθ' όλη την διάρκεια της ολοκλήρωσης της πτυχιακής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο και την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω, την οικογένεια και το φιλικό μου περιβάλλον για την στήριξη και την ενθάρρυνσή τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	15
1.1 Εξωκυττάρια κυστίδια (EVs):	15
1.2 Βιογένεση Evs	17
1.2.1 Βιογένεση Εξωσωμάτων	18
1.2.2 Βιογένεση MVs	19
1.3 Φυσιολογικός ρόλος Evs	20
1.3.1. Τα EVs ως ρυθμιστές για την παρουσίαση αντιγόνων και της ενεργοποίησης ανοσοποιητικού του ανθρώπου	20
1.3.2 Ο ρόλος των EVs στην μυελίνωση.....	21
1.3.3 Ρόλος των EVs στον Καρκίνο	22
1.3.4 Ρόλος των EVs σε Καρδιαγγειακές Ασθένειες.....	25
1.3.4.1 Ισχαιμία και μυοκάρδιο	26
1.3.4.2 Κολπική Μαρμαρυγή	26
1.3.4.3 Έμφραγμα του μυοκαρδίου	27
1.3.5 Μεταφορά Φαρμάκων	27
1.3.5.1 Χρήση Πακλιταξέλης στον καρκίνο του πνεύμονα	28
1.3.5.2 EVs από Γκρέιπφρουτ	28
1.3.5.3 EVs από δενδριτικά κύτταρα.....	29
1.4 Ο ρόλος των εξωσωμάτων	29
1.4.1 Ο ρόλος των εξωσωμάτων σε φυσιολογικές συνθήκες.....	29
1.4.1.1 Επικοινωνία νευρώνων-ολιγοδενδροκυττάρων μέσω εξωσωμάτων	30
1.4.1.2 Διαμόρφωση ανοσοποιητικού συστήματος μέσω εξωσωμάτων πλακούντα κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης.....	31
1.4.1.3 Αγγειογένεση από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) μέσω εξωσωμάτων	32
1.4.2 Εξωσώματα Παθολογικές συνθήκες	32
1.4.2.1 Εξωσώματα κατά την πρόοδο του καρκίνου.....	34
1.4.2.2 Εξωσώματα κατά την μετάσταση.....	36
1.4.3 Εξωσώματα ως ρυθμιστές στην ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου	39
1.4.3.1 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στη ρύθμιση σε αυτοάνοσες αντιδράσεις, και στην ανοσολογική ανοχή	44
2. Ενιαία Υγεία (One Health).....	48
2.1 Συγκεντρωτική δράση για την Ενιαία Υγεία.	49
2.2 Σημασία της Ενιαίας Υγείας (One Health) στις ασθένειες (λοιμώδεις)	50
2.2.1 Ενιαία υγεία στα υδάτινα περιβάλλοντα	50
2.2.2 Ενιαία υγεία και αντίσταση σε αντιβιοτικά.....	53
2.3 Αντιμικροβιακή αντοχή	54
2.3.1 Αύξηση απειλής της μικροβιακής αντοχής.....	54
2.3.2 Επιπτώσεις της AMR σε οικονομία και υγεία.....	55

2.3.2.1 Πολιτικές παρεμβάσεις στην AMR	55
2.3.3 Περιβαλλοντικός ρόλος	55
2.3.4 Η επίδραση της COVID-19 στην AMR	56
2.3.5 Εθνικά σχέδια δράσεις για την AMR	56
2.4 Λοιμώδεις ασθένειες	57
2.4.1 Ζωονόσοι	57
2.4.1.1 Γρίπη Πτηνών	57
2.4.1.2 Ο ρόλος της κλιματικής αλλαγής	58
2.4.1.3 Νόσος Lyme	58
2.4.1.4 Πανούκλα και επίπτωση στην οικολογία	59
2.5 Υδατοκαλλιέργειες	59
2.5.1 Εισαγωγή για την ενσωμάτωση της Ενιαίας Υγείας στις ιχθυοκαλλιέργειες	59
2.5.2 Διαχείριση μη ενδημικών ειδών στην Ενιαία Υγεία	60
2.5.3 Αυξανόμενος πληθυσμός και υδατοκαλλιέργεια	61
3.Σκοπός	62
3.1 Ποιος είναι ο σκοπός εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας	62
4. Μεθοδολογία	63
4.1 Αναζήτηση Βιβλιογραφίας	63
5. Εξωσώματα και EVs σε Ψάρια	64
5.1 Εισαγωγή	64
5.2 Εξωσώματα σε διαφορετικά είδη ψαριών	65
5.2.1 Zebrafish (αγχώδες ψάρι- ζέβρα)	65
5.2.2 Πράσινο Καλκάνι (Olive Flounder)	66
5.2.3 Rock Bream (τσιπούρα)	66
5.2.4 Σολωμός Ατλαντικού	68
5.2.5 Ιαπωνική Γλώσσα (Japanese Flounder)	69
5.3 Εξωσώματα σχετικά με τον ιό της νευρικής νέκρωσης	71
5.3.1 Εισαγωγή	71
5.4 Εξωσώματα μη προερχόμενα από ψάρια για την καταπολέμηση ασθενειών τους	72
5.4.1 Ψάρι Medeka	72
5.4.2 Τιλάπια του Νείλου (Nile Tilapia)	73
5.4.3 Μπακαλιάρος Ατλαντικού	73
5.4.4 Ιριδίζουσα Πέστροφα	74
6.1 Σύνοψη Συμπερασμάτων	75
6.2 Συζήτηση ευρημάτων	75
6.2.1 Ρυθμιστές Ανοσοποιητικού	75
6.2.2 Διαφοροποίηση στα Ψάρια	75
6.3 Περιορισμοί Έρευνας	75

Βιβλιογραφία	77
--------------------	----

Περίληψη

Στην συγκεκριμένη βιβλιογραφική διπλωματική εργασία διερευνάται ο ρόλος των εξωσωμάτων στα ψάρια ως ρυθμιστές αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου, καταγράφοντας τα πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα για το ρόλο των εξωσωμάτων στη διάγνωση και στη θεραπεία ασθενειών των ψαριών. Η έρευνα για διάγνωση και θεραπεία ασθενειών των ψαριών είναι σημαντική καθώς οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην οικονομία της χώρας. Παράλληλα, στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας μια τέτοια έρευνα μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην διάγνωση, θεραπεία και στην ανάπτυξη εργαλείων προς όφελος της υγείας των ανθρώπων και των ζώων.

Τα εξωκυττάρια κυστίδια συμπεριλαμβανομένου των εξωσωμάτων, είναι μικρά εξωκυτταρικά κυστίδια που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Τα εξωσώματα εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων και χαρακτηρίζονται από το μέγεθός τους, (30-150 nm) και από το περιεχόμενό τους (πρωτεΐνες, λιπίδια, mRNA, miRNA και θραύσματα DNA) δίνοντάς τους πολυπλοκότητα τόσο στην μορφή όσο και στον ρόλο που έχουν. Εμπλέκονται σε πολυάριθμες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης και η εξέλιξη ασθενειών τόσο σε ανθρώπους και σε ζώα συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών. Τέτοιες ασθένειες μπορεί να είναι είτε καρκινικές είτε με λοιμώδη χαρακτήρα.

Παράλληλα, στη παρούσα εργασία πραγματεύεται το δυναμικό των εξωσωμάτων που μπορεί να αποτελέσουν καινοτόμο εργαλείο στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας (One Health), αφού εξετάζεται η αξιοποίηση τους ως μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ ανθρώπινης, ζωικής και περιβαλλοντικής υγείας, έχοντας έμφαση στην θεραπευτική χρήση τους για διαχείριση ζωνοσογόνων ασθενειών. Η έρευνα εστιάζει στην στοχευμένη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών που βασίζονται σε RNA για την αντιμετώπιση της αντοχής στα αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά φάρμακα.

Τελικός σκοπός της εργασίας είναι να αναδειχθεί πως ο ρόλος των εξωσωμάτων μπορεί να βοηθήσει θα αναπτυχθούν νέες μέθοδοι για έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών σε ψάρια στις υδατοκαλλιέργειες, με τα εξωσώματα να δρουν μακροπρόθεσμα στο ανθρώπινο επίπεδο ως βιοδείκτες για την μείωση επιδημιών, την διασφάλιση ποιότητας τροφής και την προστασία της δημόσιας υγείας.

Λέξεις κλειδιά: (Εξωσώματα, Ενιαία Υγεία, EVs, Υδατοκαλλιέργεια, Ψάρια, Αντιβιοτικά, Μεταφορά DNA)

Abstract

This thesis investigates the role of exosomes in fish as regulators of the interaction between pathogen and the host by referencing recent findings collected from research on the significance of exosomes in diagnosing and treating disease in fish. Research in diagnosing and treating disease in fish is very important because aquaculture in Greece plays a dominant role in the country's economy. At the same time, in the framework of One Health, these researches can contribute greatly in diagnostics, treatment and development of tools for the benefit of humans and animal health.

Extracellular vesicles, including exosomes, are small, extracellular vesicles that play a decisive part in intercellular communication. Exosomes are secreted by different types of cells and are recognized from their size (30-150 nm) and their contents (proteins, lipids, mRNA, miRNA, and DNA fragments) which reveals their complexity in form, as well as in function. They are involved in various physiological and pathological processes such as the regulation of immune response and the evolution of disease not only in humans but also animals, including fish. These medical conditions could be of cancerous or of infectious etiology.

At the same time, in this thesis, the potential of exosomes is discussed as they are a promising innovative tool in the framework of One Health, since their utility as a form of interaction between human, animal and environmental health is examined, while prioritizing their therapeutic use in managing zoonotic diseases. Research focuses in targeted transfer of therapeutic substances that are based on RNA for the treatment of resistance to antibiotics and antimicrobial drugs.

Ultimate goal of this thesis is to showcase that exosomes can contribute to the development of new methods for timely detection of illnesses in aquaculture for fish and their long term use in human medical practices as biomarkers can lead to the reduction of epidemics, assurance of good quality of food and the protection of public health.

Key Words: (Exosomes, One Health, EVs, Aquaculture, Fish, Antibiotics, DNA transfer)

Πίνακας Συντομογραφιών

mRNA	Messenger RNA
miRNA	MicroRNA
EV	Extracellular Vesicle
OMV	Outer membrane vesicle
MVB	Multivesicular Body
lncRna	long non-coding RNA
IIV	Intraluminal Vesicle
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ATPase	Adenosine 5'-TriPhosphatase
Vps4	Vacuolar protein sorting 4
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
SNARE	SNAP REceptors
PHB	Polyhydroxybutyrate
SMVs	Single Membrane Vesicles
MMVs	Multi Membrane Vesicles
PIA-MVP	Polymer Intracellular Accumulation Mechanism for Vesicle Production
GFP	Green fluorescent protein
APC	Antigen Presenting Cells
DC	Dendritic Cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
MBP	Myellin Basic Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
PLP	Proteolipid Protein
NMDA	N-methyl D-aspartate
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CSC	Cancer stem cell
ER	Endoplasmic Reticulum
UPR	Unfolded Protein Response
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
JNK	Jun N-terminal kinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor

MMP	Matrix metalloproteinase
ECM	Extracellular matrix
CAF	Cancer Associated Fibroblast
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
TGF	Transforming growth factor
Wnt	Wingless Int-1 pathway
SMC	Smooth Muscle Cell
PKB	Protein kinase B
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
HOPX	Homeodomain-only protein X
MSC	Mesenchymal stem cells
TLR	Toll-like receptors
PEG	Polyethylene glycol
siRNA	Small interfering
DNs	Self-assembled DNA nanostructures
Lamp2b	lysosomal-associated membrane protein 2
iRGD	Internalizing RGD
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HSP	Heat shock proteins
Fas L	Fas Ligand
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
NK	Natural killer
DLL4	Delta – like ligand 4
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
TME	Tumor microenvironment
DEF	Drug Efflux Pumps
SHP	Small heterodimer partner
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
BBB	Blood Brain Barrier
EGFR	Epidermal growth factor receptor
PMN	Polymorphonuclear neutrophil

HCC	Hepatocellular Carcinoma
GMP-AMP	Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate
cGAS-STING	Comprised of cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), stimulator of interferon genes
Nef	Negative Regulatory Factor
HIV	Human immunodeficiency virus
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
TAR	Trans-activation response
Cdk	Cyclin-dependent kinases
HBV	Hepatitis B virus
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
JAK	Janus kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
HbsAb	Hepatitis B surface antibody
HCV	Hepatitis C virus
HT	Hashimoto thyroiditis
Tg	Thyroglobulin
IFN	Interferon
EXO	Exosome
ΣΕΛ	Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
AMR	AntiMicrobial Resistance
ECDC	European Centre for Disease Prevention
EFSA	European Food Safety Authority
ECHA	European Chemicals Agency
EEA	European Environment Agency
EMA	European Medicines Agency
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
EID	Emerging Infectious Diseases
SARS	Severe acute respiratory syndrome
CSO	Combined Sewer Overflows
ΣΒΑ	στόχους βιώσιμης ανάπτυξης
SDG	sustainable development goals
IPPC	Integrated Pollution Prevention and Control

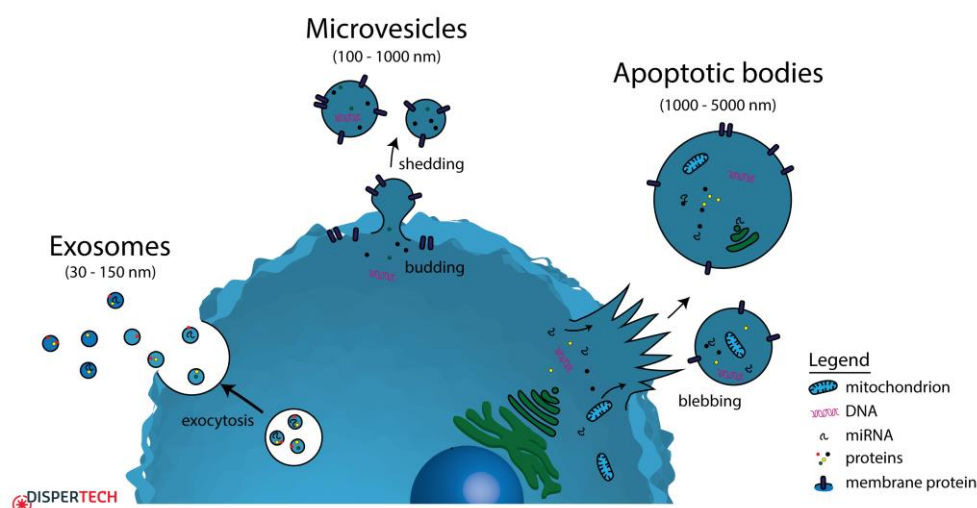
WBE	Wastewater-based epidemiology
NAP	National Action Plans
DOI	Digital Object Identifier
E.E	Ευρωπαϊκή Ένωση
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
USDA	U.S. Department of Agriculture
USGS	United States Geological Survey
PFAS	Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances
NNS	Non Native Species
iEvs	Interstitial Evs
ncRNAs	Noncoding RNA
MRP	Multidrug resistance-associated protein
RAS	Rat sarcoma virus
UC	Upper centrifugation
RBIV	Rock Bream Iridovirus
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide dismutases
CAT	Catalase
GTR	Gradual Temperature Rise
ATR	ATR
VNN	Viral Nervous Necrosis
ISKNV	Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus
HbM	Hemoglobin
Cd	Cadmium

1. Εισαγωγή

1.1 Εξωκυττάρια κυστίδια (EVs):

Τα εξωκυττάρια κυστίδια είναι νανομετρικές δομές, οι οποίες περιβάλλονται από μεμβράνη λιπιδίων, βρίσκονται στα σωματικά υγρά, κυρίως στο αίμα, στα ούρα και το σάλιο, αλλά παρατηρείται η έκκριση τους σε σχεδόν όλα τα κύτταρα. Αποτελούνται από πρωτεΐνες, πεπτίδια και λιπίδια. Η σύνθεση των EVs γίνεται με τρόπο τέτοιο, που δίνει απαντήσεις σχετικά με την κατάσταση του ιστού, και έτσι διαθέτουν μια διαγνωστική και προγνωστική δυνατότητα για την εύρεση παθολογικών καταστάσεων. Ο βασικός τους ρόλος είναι η μεταφορά μορίων από κύτταρο σε κύτταρο, η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται και ως βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες [1].

Τα EVs χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση το μέγεθος, το περιεχόμενο και τη λειτουργία τους. Οι βασικές κατηγορίες των EVs είναι, τα εξωσώματα, τα μικροκυψελίδια, τα αποπτωτικά σώματα, ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι υπάρχουν τα αυτοφαγικά EVs, τα stressed- EVs και τα κυστίδια μήτρας. Όλα εκτός από τα εξωσώματα περικλείονται σε μία μεγαλύτερη οικογένεια, αυτή των μικροκυψελιδίων (MVs). Η διαφοροποίηση τους γίνεται με βάση το τρόπο σχηματισμού τους. Πιο συγκεκριμένα, τα MVs δημιουργούνται από την προς τα έξω διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης, ενώ τα εξωσώματα προκύπτουν από την συγχώνευση των MVBs με την πλασματική μεμβράνη και έπειτα γίνεται η εξαγωγή του περιεχομένου τους [1].



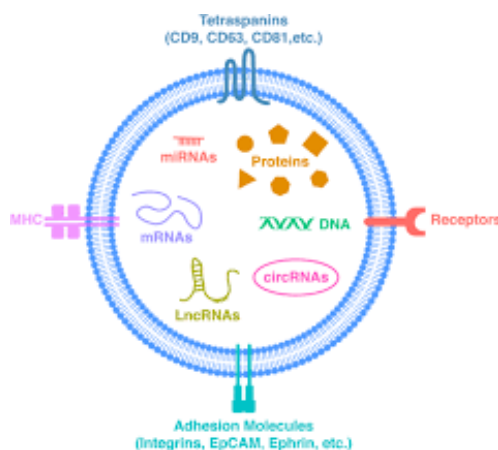
Εικόνα 1: Κατηγορίες EVs (Πηγή εικόνας: [2]).

Για τη μελέτη της μορφολογίας των EVs, είναι αρκετά σημαντική η ανάπτυξη προηγμένων οπτικών μεθόδων που παριστάνουν εικονικά, σε μικροσκοπικό βαθμό τα χαρακτηριστικά των κυστιδίων αυτών. Η κλίμακα μεγέθους των EVs κυμαίνεται από τα 50-200nm έχοντας ένα ηλεκτροκινητικό δυναμικό

(zeta potential). Η μεμβράνη τους αποτελείται από φωσφολιπίδια ενώ τα σωματίδια αυτά πέρα από τις πρωτεΐνες εμπεριέχουν πλήθος βιοενεργών στοιχείων όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, mRNA, miRNA and lncRNA), οργανίδια και μολυσματικά (λοιμώδη) μόρια [1].

Μορφολογικά τα EVs μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τον τύπο τους και τις βιοϊδιότητές τους. Ξεκινώντας από τα μικρότερα, τα εξωσώματα συναντιούνται σε διαμέτρους 30-150nm και σε σχηματισμούς είτε κυκλικούς είτε ημικυκλικούς (cup shaped), γεγονός που οφείλεται στην συγχώνευση των MVBs που προαναφέρθηκε με την πλασματική μεμβράνη. Τα μικροκυτίδια (μικροκυψελίδια) έχουν διαμέτρους 100-1000nm και προέρχονται από την απευθείας εξώθηση τους από την πλασματική μεμβράνη. Ο μηχανισμός αυτός τους δίνει ένα εμφανώς πιο ακανόνιστο σχήμα. Τα αποπτωτικά σώματα (apoptotic bodies) έχουν διαστάσεις 1-5μm, γεγονός που τα καθιστά τα μεγαλύτερα EVs, ενώ παράλληλα έχουν πιο σύνθετη και διαφορετική μορφολογία αφού προέρχονται από προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κυττάρων. Σαν αποτέλεσμα περιέχουν μέσα τους ενδοπυρηνικό υλικό και κατεστραμμένους κυτταρικούς ιστούς. [3].

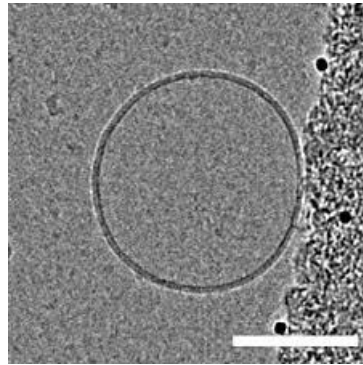
Για να καθοριστεί η μορφολογία των EVs θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η δομική τους σύνθεση, αφού η ακαμψία και η σταθερότητα των μεμβρανών τους οφείλεται στην πλούσια περιεκτικότητά τους σε χοληστερόλη, κεραμίδες και σφιγγομυελίνη. Η σύνθεση των ουσιών αυτών βοηθάει τα κυτίδια στην σύντηξή τους με τα κύτταρα στόχους. Οι πρωτεΐνες CD9, CD63, CD81 που εμφανίζονται στην μεμβράνη είναι χαρακτηριστικές και συντελούν στην άκαμπτη δομή και την προστασία των EVs [1], [4].



Εικόνα 2: Δομή και σύνθεση των EVs (Πηγή Εικόνας: [5]).

Μέσω των μικροσκοπικών μεθόδων που έχουν ανακαλυφθεί και μελετών που έχουν γίνει στα εξωκυττάρια κυτίδια με τα μέσα όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία (Cryo-electron microscopy, atomic force microscopy), έχει δειχθεί ότι τα EVs έχουν μια λεία εξωτερική επιφάνεια που εν μέρη μπορεί να εμφανίζει εξογκώματα και ανωμαλίες ανάλογα με τον τρόπο που έχει πραγματοποιηθεί η

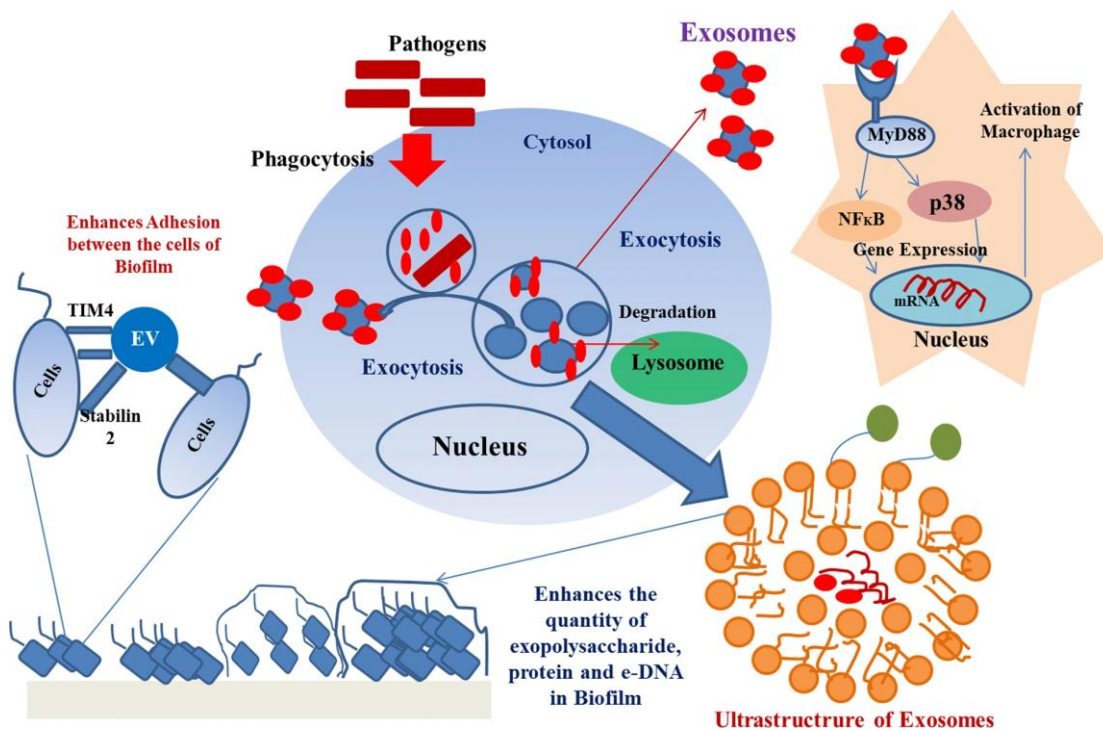
βιογένεση τους. Η εξωτερική μορφολογία των κυστιδίων αυτών, επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο τα EVs αναγνωρίζονται από τα κύτταρα δέκτες, καθώς και τον χρόνο παραμονής στα υγρά του σώματος [3], [4].



Εικόνα 3: Μικροσκοπική απεικόνιση EVs (Πηγή εικόνας: [6]).

1.2 Βιογένεση Evs

Όπως έχει γίνει αναφορά σε προηγούμενες παραγράφους τα κυστίδια ταξινομούνται σε διάφορους υπότυπους ανάλογα με το μέγεθος τους. Κάθε είδος υπότυπου, μεταφέρει συγκεκριμένα μόρια που προδίδουν την κυτταρική τους προέλευση όπως πρωτεΐνες. Αυτή η πολυμορφία που υπάρχει, δίνει την δυνατότητα έρευνας ώστε σε διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις να μπορούν να διακριθούν οι λειτουργικοί ρόλοι. [7]



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της βιογένεσης του εξωσώματος, του ρόλου του στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή (Πηγή Εικόνας: [8]).

1.2.1 Βιογένεση Εξωσωμάτων

Η πολύπλοκη διαδικασία της βιογένεσης εξωσωμάτων ξεκινάει με την ενδοκυττάρωση του μοριακού φορτίου στο κύτταρο. Αρχικά σχηματίζονται πρώιμα ενδοσώματα που δρουν σαν κέντρα διαλογής για το εσωτερικό υλικό. Τα ενδοσώματα είναι αυτά από τα οποία θα καθοριστεί η πορεία του φορτίου αφού είτε θα στραφεί στην λυσοσωμική αποικοδόμηση, είτε προς οδούς ανακύκλωσης είτε σε δρόμο ωρίμανσης σε ώριμα ενδοσώματα. Η ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων ενέχει αλλαγές σημαντικές στην σύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης τους όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση των πρωτεϊνών Rab5 και Rab11 που είναι υπεύθυνες για την κινητικότητα και την λειτουργικότητά τους, και η αλλαγή της σφιγγομυελίνης με κεραμίδια (λιπίδια). Τα ώριμα ενδοσώματα θα εξελιχθούν σε MVBs (πολυκυψελιδικά σώματα, σχηματίζοντας ILVs (κυστίδια με εισερχόμενη κοιλότητα) εγκλωβίζοντας το φορτίο στο εσωτερικό τους. [9]

Τα ILVs για να γίνουν τελικά εξωσώματα έχουν δυο πρωταρχικούς μηχανισμούς: α) τον ESCRT εξαρτώμενο και β) τον ESCRT ανεξάρτητο μηχανισμό. Η ESCRT εξαρτώμενη οδός εξαρτάται από την συντονισμένη δράση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Το σύστημα περιλαμβάνει τέσσερα σύμπλοκα (ESCRT-0, -I, -II και -III) αλλά και συνδεδεμένες πρωτεΐνες όπως η ALIX που διαχωρίζουν το φορτίο σε ειδικές μικροπεριοχές διευκολύνοντας έτσι την παραμόρφωση της μεμβράνης ώστε να δημιουργηθεί το ILV. Η διάσπαση της μεμβράνης είναι μια διαδικασία που καθορίζεται με την συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση του ESCRT-III η οποία ως μέσω τροφοδοσίας χρησιμοποιεί την δραστηριότητα ATPase του Vps4. Από την άλλη, η ανεξάρτητη ESCRT οδός αξιοποιεί μηχανισμούς που βασίζονται σε λιπίδια όπως για παράδειγμα η αυτόματη καμπυλότητα που επάγουν τα κεραμίδια ή η οργάνωση της μεμβράνης σε λειτουργικές περιοχές για την διαλογή φορτίου που διεγείρεται από τις τετρασπανίνες π.χ. CD63 [9].

Η προαναφερόμενη διαλογή φορτίου είναι μια διαδικασία της βιογένεσης των εξωσωμάτων που εξασφαλίζει ότι το σωστό μοριακό περιεχόμενο θα φορτωθεί στα ILVs. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για τα εξωσώματα είναι σημασμένες με μονο-ουβικουιτίνη, μια ουσία που τους προσδίδει την δυνατότητα αναγνώρισης από τα συστατικά του ESCRT. Σαν σήματα διαλογής λειτουργούν και οι αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA ή οι αλληλεπιδράσεις σήμανσης με βάση τα λιπίδια. Ο μηχανισμός αυτός της διαλογής φορτίου εξασφαλίζει την ενσωμάτωση διαφόρων μορίων που συμπεριλαμβάνουν μεταξύ άλλων πρωτεΐνες, λιπίδια, μόρια mRNA, ρυθμιστικά μόρια miRNA και άλλα νουκλεϊκά οξέα, στα ILVs για να γίνει η τελική απελευθέρωσή τους ως εξωσώματα [9].

Όταν τελικά σχηματιστούν τα MVBs, η τύχη τους ορίζεται από ποικίλους παράγοντες. Μπορεί είτε να συγχωνευθούν μαζί με λυσοσώματα με αποτέλεσμα να ανοικοδομηθεί το φορτίο ή να ενωθούν με την

πλασματική μεμβράνη για να απελευθερωθούν σαν εξωσώματα στον εξωκυττάριο χώρο. Η «απόφαση» αυτή μπορεί να ρυθμιστεί από ειδικές GTPάσες όπως η Rab7 που προωθεί την ένωση με λυσοσώματα, και η Rab31 που υποστηρίζει την σύντηξη για την απελευθέρωση ως εξωσώματα. Περαιτέρω παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία αυτή μπορεί να είναι οι πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, η σύνθεση λιπιδίων και οι σχετιζόμενες διαδικασίες με την αυτοφαγία [9].

Το τελικό στάδιο της βιογένεσης των εξωσωμάτων είναι η έκκριση τους. Κινητήριες πρωτεΐνες όπως η κινεζίνη και η ντινείνη μεταφέρουν τα MVBs από το εσωτερικό του κυττάρου στην περιφέρεια του, μέσω των μικροσωληνίσκων και των νηματίων ακτίνης. Η συγχώνευση με την πλασματική μεμβράνη προωθείται από SNARE πρωτεΐνες, Rabάσες, GTPάσες, και παράγοντες πρόσδεσης, που επιτρέπουν την απελευθέρωση των εξωσωμάτων στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Μέσα στους μηχανισμούς ρύθμισης είναι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των SNARE πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων με τα μόρια RNA [9].

Μέσα από αυτές τις λεπτομερείς συντονισμένες διαδικασίες, γίνεται ο σχηματισμός, η ταξινόμηση και η έκκριση των εξωσωμάτων, που έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση και διακυτταρική επικοινωνία [9].

1.2.2 Βιογένεση MVs

Η κατηγοριοποίηση των MVs γίνεται σε δύο τύπους: α) Μονής στρώσης s-MVs και β) πολλαπλής στρώσης (m-MVs). Τα πρώτα προέρχονται από την εξωτερική μεμβράνη και εγκλωβίζουν κατά κύριο λόγο περιπλαστικές ενώσεις, ενώ τα m-MVs έχουν τα συστατικά τους τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτή η ενθυλάκωση περιπλαστικού περιεχομένου μαζί με κυτταροπλασματικά υλικά. Από τους βασικότερους παράγοντες σχηματισμού MVs είναι η πίεση στο περίβλημα, που οφείλεται στην δόμηση της μεμβράνης. Η εν λόγω πίεση (stress) προκύπτει συχνότερα από διαταραχές στην δομή της μεμβράνης, ή από την συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυμερών όπως είναι το πολυυδροξυβουτυρικό οξύ PHB. [10].

Το συσσωρευμένο PHB κατέχει καθοριστικό ρόλο για την ενεργοποίηση σχηματισμού των MVs μέσω του μηχανισμού Ενδοκυτταρικής Συσσώρευσης Πολυμερών για την Παραγωγή Κυστιδίων PIA-MVP (Polymer Intracellular Accumulation Mechanism for Vesicle Production). Η αρχή του συστήματος αυτού βασίζεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης, η οποία παράγει ακετυλο-CoA που μέσω μια ενζυμικής αλληλουχίας αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από τα ένζυμα PhbA, PhbB και PhbC, μετατρέπεται σε PHB. Ο μηχανισμός στρες στο περίβλημα που επάγει τον σχηματισμό κυστιδίων οφείλεται σε μία αύξηση της εσωτερικής πίεσης στην κυτταρική μεμβράνη που με την σειρά της είναι

αποτέλεσμα της ανόδου συγκέντρωσης της γλυκόζης. Ο τύπος MVs που θα παραχθεί είναι εξαρτώμενος από την ένταση της πίεσης. Τα s-MV κυριαρχούν στα χαμηλότερα επίπεδα PHB που αντιστοιχεί σε χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης και όπου το στρες είναι σε μέτρια επίπεδα στην μεμβράνη. Αντιθέτως, στα υψηλά επίπεδα PHB επικρατούν τα m-MVs αφού υπάρχει μεγάλη παραμόρφωση μεμβράνης η οποία προκαλείται από την πίεση στο εσωτερικό [10].

Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της παραπάνω διαδικασίας έχει χρησιμοποιηθεί η GFP (Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), αποτελώντας μοριακό δείκτη διάκρισης των s-MVs από τα m-MVs. Η ουσία αυτή εκφράστηκε μέσα στο κυτταρόπλασμα των τροποποιημένων Gram αρνητικών βακτηρίων και περικλείστηκε αποκλειστικά στα m-MVs αφού περιλαμβάνουν υλικό μεμβράνης που έχει την ικανότητα να περικλείει κυτταροπλασματικό περιεχόμενο. Τα s-MVs έχουν την ιδιαιτερότητα να μεταφέρουν μόνο περιπλασματικές ενώσεις συνεπώς στο συγκεκριμένο πείραμα δεν εγκλώβισαν την GFP. Με την χρήση αυτού του συστήματος, η ερευνητική κοινότητα καθόρισε ένα κρίσιμο όριο 15 g/L για την συγκέντρωση γλυκόζης, κάτω από το οποίο επικρατεί ο σχηματισμός των s-MVs. Αντιθέτως, στη περίπτωση όπου η συγκέντρωση γλυκόζης συναντάται πάνω από το όριο αυτό, κυριαρχούν τα m-MVs. Για την ποσοτικοποίηση των MVs γίνεται συνήθως φυγοκέντριση και χρήση μικροσκοπίων φθορισμού που μετράει την ενθυλάκωση GFP εντός τους [10].

1.3 Φυσιολογικός ρόλος Evs

Τα EVs είναι σημαντικοί μεσολαβητές για την ενδοκυτταρική επικοινωνία, και πιο συγκεκριμένα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων σε βιολογικώς περίπλοκα περιβάλλοντα. Τα μεμβρανοειδή αυτά κυστίδια, μεταφέρουν μόρια υψηλής βιοδραστικότητας, όπως το RNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια με σκοπό να βοηθήσουν στοχευμένα σε φυσιολογικές διαδικασίες των κυττάρων όπως στην ανοσολογική απόκριση και στην ανοικοδόμηση ιστών. Έχει γίνει φανερό επίσης ότι τα EVs συμβάλλουν στην ομοίωση του κυττάρου, αφού μια ακόμη διεργασία που επιτελούν είναι η απομάκρυνση πρωτεϊνών, και η μεταφορά τους από κύτταρο σε κύτταρο. Τα τελευταία χρόνια επίσης μελετώνται οι θεραπευτικές τους ικανότητες σε ασθένειες, κυρίως νευροεκφυλιστικές [11].

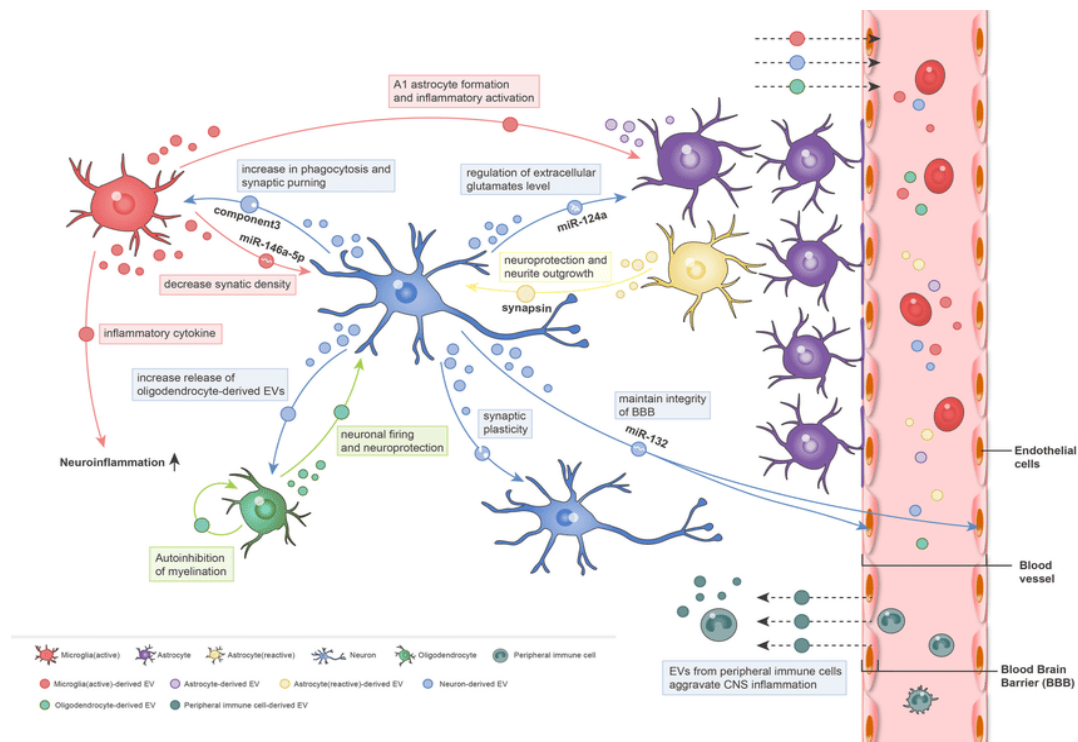
1.3.1. Τα EVs ως ρυθμιστές για την παρουσίαση αντιγόνων και της ενεργοποίησης ανοσοποιητικού του ανθρώπου

Τα EVs και κυρίως τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, , και συγκεκριμένα στην διαδικασία παραγωγής αντιγόνων που είναι και ο θεμελιώδης μηχανισμός και για την ενεργοποίησή της. Τα εξωσώματα είναι υπεύθυνα για την μεταφορά αντιγόνων

στα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα APC (Antigen Presenting Cells) όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα DC (Dendritic Cells). Όταν τα εξωσώματα προσληφθούν από τα κύτταρα αυτά, γίνεται η επεξεργασία των αντιγόνων από τα DC και μέσω των μορίων του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex) ενεργοποιούνται τα T-λεμφοκύτταρα. Η εξωκυτταρική διαμεσολάβηση που συμβαίνει, ενισχύει την ενεργοποίηση των CD8⁺ T- λεμφοκυττάρων (που κατέχουν κυτταροτοξικό χαρακτήρα) και τους επιτρέπεται την εξάλειψη κυττάρων που έχουν προσβληθεί από παθογόνα. Ο μηχανισμός αυτός έχει διακυτταρικό πρόσημο και είναι κρίσιμος για την διατήρηση της ανοσο-επαγρύπνισης και την λειτουργία της ανοσολογικής απόκρισης [11], [12].

1.3.2 Ο ρόλος των EVs στην μυελίνωση

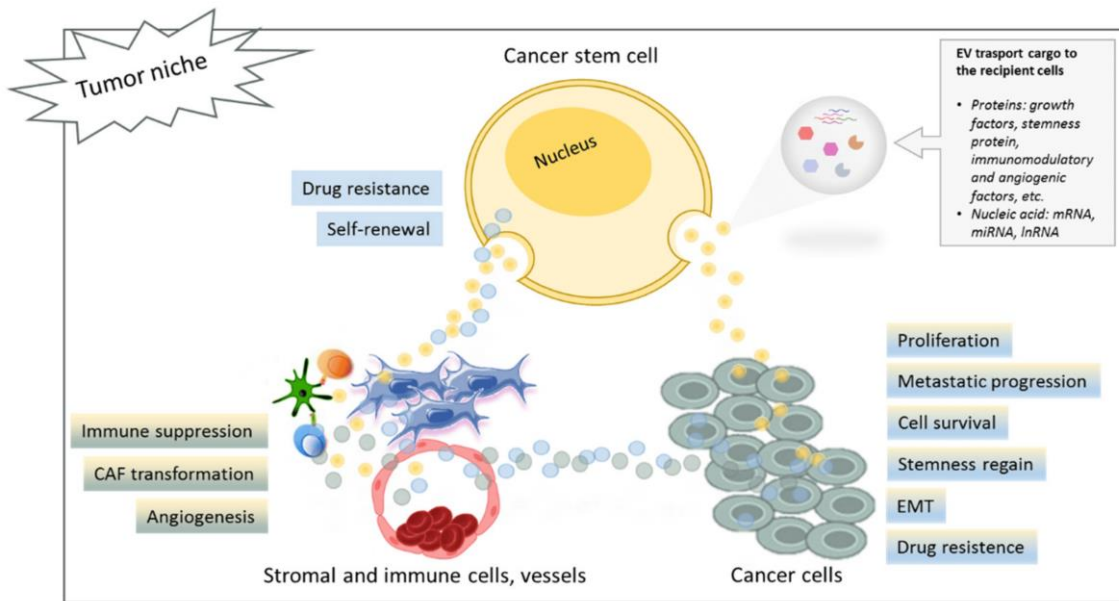
Τα EVs που εκκρίνονται από ολιγοδενδροκύτταρα, είναι βασικοί παράγοντες για την επισκευή των χιτώνων μυελίνης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Οι πρωτεΐνες με τις οποίες είναι εμπλουτισμένα τα EVs είναι η MBP (Myellin Basic Protein) η MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) και η PLP (Proteolipid Protein). Η ποσότητα έκκρισης των πρωτεϊνών αυτών στα κυστίδια καθορίζεται από την νευρωνική δραστηριότητα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό των ενεργών αξόνων που ελευθερώνουν γλουταμικό οξύ και διεγείρουν με αυτό τον τρόπο τους υποδοχείς NMDA και AMPA στα ολιγοδενδροκύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί με τη σειρά της την σηματοδότηση ασβεστίου ενδοκυτταρικά και οδηγεί στην έκλυση EVs τα οποία είναι εμπλουτισμένα με την πρωτεΐνη της μυελίνης και άλλους τροφικούς παράγοντες. Η συνεισφορά των EVs δεν ανέρχεται μόνο στο γεγονός ότι προάγουν την μυελίνωση αλλά παρέχουν ταυτόχρονα και προστασία στους νευρώνες από το οξειδωτικό στρες και την στέρηση των θρεπτικών συστατικών, τονίζοντας έτσι τον διπλό ρόλο στην δομική συντήρηση και στη νευροπροστασία. Τέλος, μέσω των EVs πραγματοποιείται και η ρύθμιση της ανάπτυξης αλλά και της διαφοροποίησης των ολιγοδενδοκυττάρων, εξασφαλίζοντας έτσι την επισκευή των μυελικών χιτώνων [11].



Εικόνα 5: Ρόλος των EVs στο ΚΝΣ αφού γίνει η προσβολή (Πηγή Εικόνας: [13]).

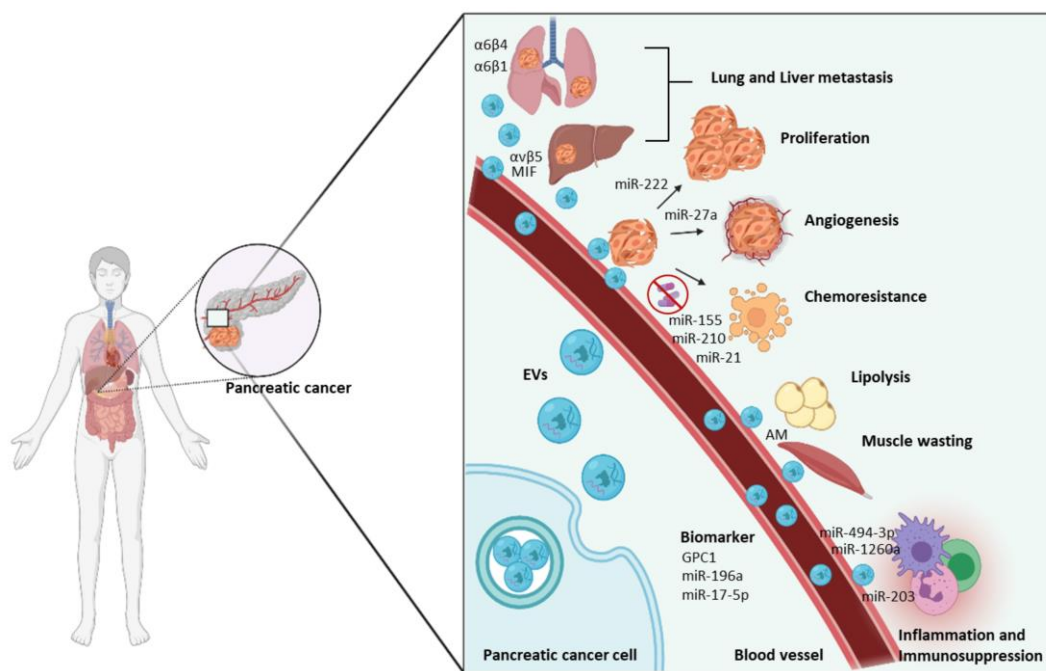
1.3.3 Ρόλος των EVs στον Καρκίνο

Στο πεδίο του καρκίνου, τα EVs έχουν αναγνωριστεί σαν παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη και την μετάσταση όγκων. Συγκεκριμένα, σε κάποιες περιπτώσεις, τα EVs μεταφέρουν μόρια και πρωτεΐνες που έχουν ογκογονικό ρόλο σε άλλα γειτονικά κύτταρα προσδίδοντάς τους κακοήθη χαρακτηριστικά. Τα κυστίδια πέρα από την ανάπτυξη των όγκων, καταλύουν και την μη ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων από τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού. Για τους λόγους αυτούς, τα EVs έχουν αναδειχθεί και ερευνώνται σαν πιθανοί βιοδείκτες για διάγνωση καρκινικών κυττάρων, αλλά χρησιμοποιούνται επίσης ερευνητικά και σαν μεταφορείς φαρμάκων σε στοχευμένους ιστούς [14].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της επικοινωνίας μεταξύ CSCs και όγκου (Πηγή Εικόνας: [15]).

Τα EVs που προέρχονται από τον καρκίνο του παγκρέατος είναι αποδεδειγμένο ότι προκαλούν στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο ER μη καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, μέσω των EVs γίνεται η μεταφορά βιοδραστικού φορτίου, συμπεριλαμβανομένου πρωτεϊνών, λιπιδίων, RNA και μεταβολιτών, που έχουν ως αποτέλεσμα όταν προσληφθούν από τα κύτταρα δέκτες να προκαλείται διαταραχή στην κυτταρική τους ομοιόσταση. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της διατάραξης είναι η ανάπτυξη οξειδωτικού στρες σε συνδυασμό με την συσσώρευση των κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (απόκριση των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών UPR (Unfolded Protein Response)). Οι αλλαγές αυτές μέσα στο κύτταρο αναπρογραμματίζουν τα μη καρκινικά κύτταρα σε ένα φαινότυπο υποστηρικτικό προς ανάπτυξη καρκινικών χαρακτηριστικών και σχηματισμού όγκου, επάγοντας έτσι την κακοήθεια. Τα EVs μπορούν να ενεργοποιήσουν και μονοπάτια φλεγμονής, επηρεάζοντας την έκκριση παραγόντων όπως ο NF-κB και ο JNK, δημιουργώντας έτσι μικροπεριβάλλον ευνοϊκό ως προς την ανάπτυξη όγκου. Επομένως, τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να τροποποιούν από απόσταση (έμμεσα) το περιβάλλον τους για να διατηρούν την εξέλιξη του όγκου [16].



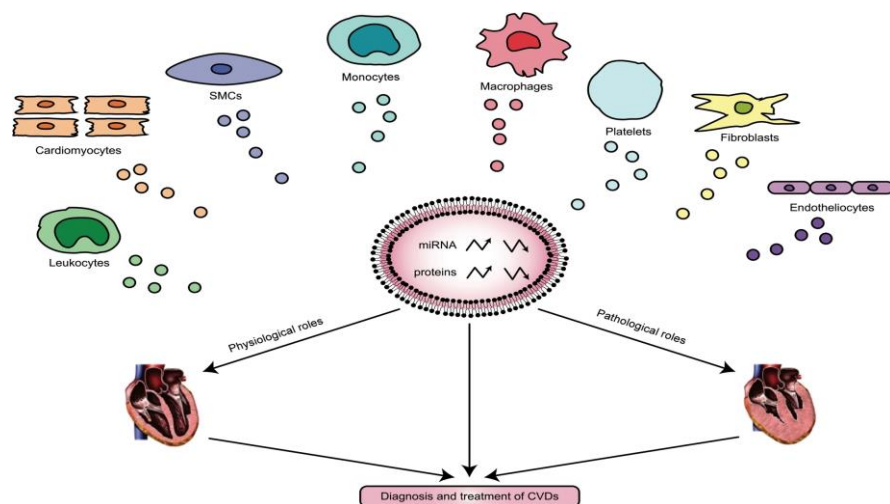
Εικόνα 7: Ο ρόλος των EVs στον καρκίνου του παγκρέατος (Πηγή Εικόνας: [17]).

Τα μιγκρασώματα (migrasomes) είναι ένας υποτύπος EVs με μεγάλη εξειδίκευση, και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αγγειογένεσης, ενός μηχανισμού απαραίτητου για την μετάσταση και εξέλιξη του όγκου. Τα μιγκρασώματα είναι εμπλουτισμένα με προ αγγειογενετικά μόρια όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), με τον σχηματισμό τους να γίνεται στις ίνες ανάσχυσης των μεταναστευτικών κυττάρων. Όπως έχει αποδειχθεί στα μοντέλα των εμβρύων νεοσσών, τα κυστίδια αυτά (migrasomes) έχουν την ικανότητα να προάγουν την μετανάστευση και των πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας τον οργανισμό στον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων. Εκτός του φορτίου με αγγειογενετική προέλευση, τα μιγκρασώματα διαθέτουν ένζυμα, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (MMPs), οι οποίες διασπούν την Εξωκυττάρια μήτρα (ECM) και έτσι διευκολύνεται η επέκταση του αγγειακού δικτύου και συνεπώς διευκολύνεται η εισβολή του όγκου. Άλλη ιδιότητα των μιγκρασωμάτων είναι ο ρόλος που έχουν για τον ποιοτικό έλεγχο των μιτοχονδρίων στην κυτταρική μετανάστευση. Το γεγονός ότι μπορούν να δεσμεύουν και να απομακρύνουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, σημαίνει ότι γίνεται επιτρεπτή η διατήρηση της μεταβολικής αποτελεσματικότητας στα καρκινικά κύτταρα, που θα τα βοηθήσει για την μετέπειτα εισβολή τους σε ιστούς. Οι πολύπλευροι ρόλοι των μιγκρασωμάτων τα καθιστούν ελκυστικό στόχο στην επιστημονική κοινότητα για θεραπείες που αποσκοπούν στην παύση της αγγειογένεσης [16].

Ινοβλάστες που προέρχονται από τον καρκίνο (CAF: Cancer Associated Fibroblast), παράγουν EVs τα οποία προωθούν την επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition), η οποία είναι μια διαδικασία κρίσιμη πρώτα για την δημιουργία του όγκου και έπειτα για την μετάσταση του. Τα συγκεκριμένα CAF κύτταρα είναι εφοδιασμένα με φορτία που προάγουν τον όγκο, κάποια από αυτά είναι τα ρυθμιστικά μόρια miRNAs miR-21, miR-143, miR-378e αλλά και με πρωτεΐνες σαν τον TGF- β , και με παράγοντες σήμανσης του μονοπατιού Wnt. Οι ουσίες αυτές κάνουν έναν επαναπρογραμματισμό στα καρκινικά κύτταρα, ενισχύοντας τους μεσεγχυματικούς δείκτες N-κανθερίνη και βιμεντίνη, και ταυτόχρονα καταστέλλουν επιθηλιακούς δείκτες όπως η E-κανθερίνη, και με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα γίνονται πιο διεισδυτικά. Τα EVs αυτά θα συμβάλλουν στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, αφού παραδίδουν μεταβολίτες και ένζυμα με στόχο να βοηθήσουν τα ογκοκύτταρα να επιβιώσουν στις συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και υποξίας περιβάλλοντος. Στον καρκίνο του μαστού, τα EVs προερχόμενα από CAF κύτταρα που παράλληλα φέρουν τα ρυθμιστικά μόρια miR-125b και miR-21 που είναι συνδεδεμένα με την αντίσταση στις ουσίες της χημειοθεραπείας, ενώ στον παγκρεατικό καρκίνο αυτά τα EVs που εκφράζουν το γονίδιο CD9 ενισχύουν την καρκινική τάση για μετάσταση. Συμπερασματικά αναδεικνύεται ο δίμορφος ρόλος των EVs των CAF κυττάρων και σαν θεραπευτικοί στόχοι και σαν κινητήριοι μοχλοί στην εξέλιξη του καρκίνου [14], [16].

1.3.4 Ρόλος των EVs σε Καρδιαγγειακές Ασθένειες

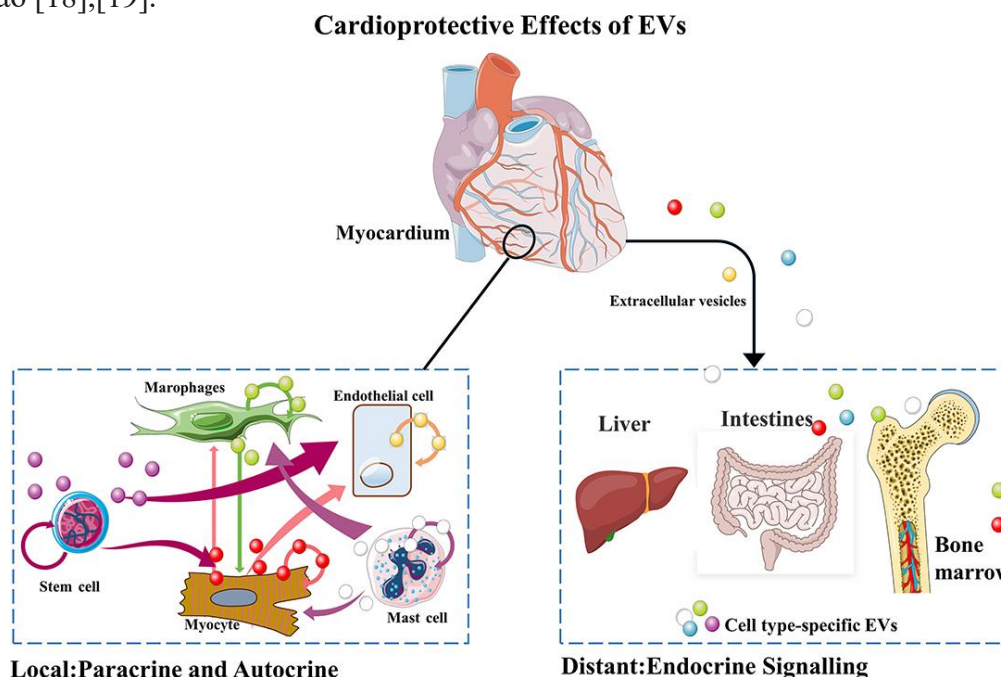
Ο ρόλος των EVs επεκτείνεται πέρα από καρκινικές ασθένειες και σε άλλες παθολογικές συνθήκες, τόσο μεταβολικές αλλά και καρδιαγγειακές ασθένειες. Τα EVs που προέρχονται από λιπώδη ιστούς ανθρώπων με παχυσαρκία επηρεάζουν την αντίσταση του οργανισμού στην ινσουλίνη, και συμβάλλουν σε διαταραχές της επικοινωνίας με τα εγκεφαλικά κύτταρα αφού το μοριακό φορτίο που μεταφέρουν τα κυστίδια μπορεί να περιέχουν φλεγμονώδεις ουσίες [14].



Εικόνα 8: Προέλευση, περιεχόμενο και ρόλος των EVs στις καρδιαγγειακές παθήσεις (Πηγή Εικόνας: [18]).

1.3.4.1 Ισχαιμία και μυοκάρδιο

Τα EVs επηρεάζουν την αγγειογένεση και την λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, έχοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ισχαιμία του μυοκαρδίου. Σε παθολογικές περιπτώσεις όπως αυτής της αθηροσκλήρωσης, τα εξωκυτταρικά κυστίδια που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, πλούσια με ρυθμιστικά μόρια miRNA-92a-3p ανακόπτουν την αγγειογένεση σε αυτά τα κύτταρα δείκτες με την χρήση ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από την θρομβοσπονδίνη-1. Τα EVs που απομονώθηκαν από τους ορούς ασθενών με ισχαιμία του μυοκαρδίου, φάνηκαν να προάγουν την αγγειογένεση με την αλληλεπίδραση του miRNA-939 με οξείδιο του αζώτου. Παράλληλα, τα EVs αυτά είναι χρήσιμα και για την σηματοδότηση φλεγμονών που βρίσκονται εντός των αγγειακών πλακών. Τα Αφρώδη (foam) EVs θα ενισχύσουν την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) με την ενεργοποίηση βασικών σηματοδοτικών οδών, όπως αυτής της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB) και της κινάσης (ERK) που αποτελεί εξωκυτταρικό σήμα, και θα οδηγήσουν τελικά στην απορρύθμιση της πλάκας, εξελίσσοντας έτσι την αθηροσκλήρωση. Σχετικά με τις ενδοθηλιακές βλάβες, τα EVs που περιέχουν το ρυθμιστικό μόριο miRNA-126 έχουν δείχθει πως βοηθούν στην επιδιόρθωση τους μετά από κάποιο τραυματισμό [18],[19].



Εικόνα 9: Μηχανισμοί επικοινωνίας της καρδιάς με την μεσολάβηση των EVs (Πηγή Εικόνας: [20]).

1.3.4.2 Κολπική Μαρμαρυγή

Τα EVs στην κολπική μαρμαρυγή, συμβάλλουν σε παθολογικές διεργασίες όπως η ηλεκτρική αναδιομόρφωση και η κολπική ίνωση, που μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας στην εξέλιξη της νόσου. Απομονωμένα κυστίδια EVs από κολπικούς ιστούς σε άτομα που νοσούν φέρουν τα ρυθμιστικά μόρια

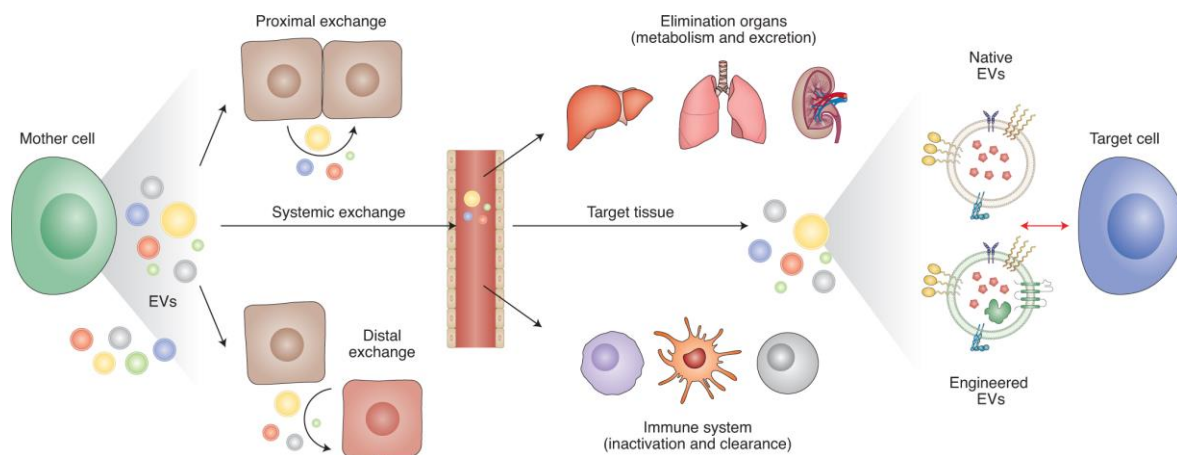
miRNA-21-3p και miRNA-199a-3p των οποίων κεντρικός ρόλος είναι η υπερτροφία του κολπικού ιστού. Τα miRNAs αυτά έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τους βασικούς αντιϊνωτικούς ρυθμιστές όπως η HOPX (Homeodomain-only protein X) και παράλληλα τροποποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες όπως η δεσμευτική πρωτεΐνη GATA4 με συνέπεια να ανακατασκευάζεται δομικά ο ιστός και να δημιουργείται πάχυνση και δυσκαμψία του κόλπου. Με την κολπική ίνωση διαιωνίζονται τα αρρυθμογόννα κυκλώματα. Επίσης, τα EVs αυτά επηρεάζουν τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες του κόλπου τροποποιώντας τα γονίδια έκφρασης των ιοντικών διαύλων. Αυτές οι αλλαγές διευκολύνουν την έναρξη και την διατήρηση της κολπικής μαρμαρυγής [18], [19].

1.3.4.3 Έμφραγμα του μυοκαρδίου

Μέσω αντιφλεγμονωδών και αναγεννητικών παραγόντων, τα EVs που προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC: Mesenchymal Stem Cell) μπορεί να αποδειχθούν θεραπευτικοί παράγοντες για την ίαση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Μπορούν να μεταφέρουν βιοδραστικά μόρια σαν το miRNA-182 που καταστέλλουν τις φλεγμονές μέσω της απορρύθμισης της οδού του TLR4 υποδοχέα και να παρέχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Με αυτό το τρόπο, το οξειδωτικό στρες μειώνεται, και ταυτόχρονα προάγεται η αγγειογένεση αποκαθιστώντας έτσι τους ιστούς στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Σε προκλινικά μοντέλα έχουν διερευνηθεί τα EVs μη-φυσικής προέλευσης (κατασκευασμένα) φορτωμένα με miRNA-21, τα οποία έχουν χορηγηθεί σε περιστατικά ισχαιμικού μυοκαρδίου, με αποτέλεσμα να μειωθεί το μέγεθος του εμφράγματος, και να βελτιωθεί σημαντικά η λειτουργία της καρδιάς. Η επιστήμη της βιοτεχνολογίας έχει φέρει εξελίξεις και στην κατασκευή EVs, με ειδικά πεπτίδια, έχοντας στόχο την καταπολέμηση της ισχαιμίας, με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο εντοπισμός τους σε εμφραγματικές περιοχές [18],[19].

1.3.5 Μεταφορά Φαρμάκων

Τα EVs γίνονται συνεχώς αντικείμενο μελέτης ως οχήματα για την μεταφορά φαρμάκων και μορίων RNA, ως επί το πλείστον για περιοχές που είναι δύσκολο να θεραπευτούν με άλλες μεθόδους ή φάρμακα, όπως ο εγκέφαλος. Ο στόχος των EVs αυτών είναι μια μορφή εναλλακτικής γονιδιακής θεραπείας, ή ακόμα και χημειοθεραπειών σε στοχευμένες περιοχές. Ένα από αυτά τα παραδείγματα είναι η μεταφορά siRNA σε περιοχές του εγκεφάλου που υπάρχουν γονίδια σχετιζόμενα με νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η ικανότητα των EVs να διαπερνούν τα βιολογικά εμπόδια όπως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, και να παραδίδουν θεραπευτικό φορτίο στον ιστό επιλογής, είναι πολλά υποσχόμενο καινοτόμο εργαλείο για μη κυτταρικές θεραπείες [11].



Εικόνα 10: Μηχανισμός των EVs (Πηγή Εικόνας: [21]).

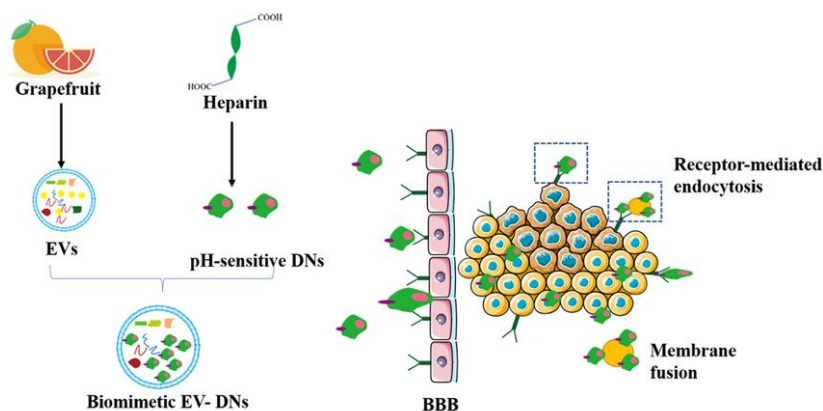
1.3.5.1 Χρήση Πακλιταξέλης στον καρκίνο του πνεύμονα

Ένα παράδειγμα της χρήσης εξωκυτταρικών κυστιδίων για την μεταφορά φαρμάκων είναι αυτό των EVs που προέρχονται από μακροφάγα και είναι εμπλουτισμένα με πακλιταξέλη, έναν χημειοθεραπευτικό παράγοντα, σημαντικό για την θεραπεία μετάστασης στον καρκίνο του πνεύμονα. Η χρήση γίνεται από EVs μακροφάγων καθώς αυτά έχουν την εγγενή ικανότητα να εγκαθίστανται σε περιοχές όγκων. Αυτά τα κυστίδια είναι χημικά τροποποιημένα με αμινοαιθυλικό ανυδρίτη-πολυαιθυλενογλυκόλης PEG (aminoethyl anhydride-polyethylene glycol) για να ενισχυθεί η θεραπευτική τους ιδιότητα και να παρατείνει τον χρόνο κυκλοφορίας τους στον οργανισμό. Με την τροποποίηση αυτή αυξάνεται και η ιδιότητά τους να στοχεύουν ιστούς πνευμόνων. Σε προκλινική έρευνα που έγινε με ποντίκια, φάνηκε ότι EVs φορτωμένα με πακλιταξέλη παρουσίασαν εμφανώς βελτιωμένα αποτελέσματα για θεραπεία, σχετικά με την ελεύθερη χορηγούμενη πακλιταξέλη, αφού συσσωρεύτηκε παραπάνω φαρμακευτική ουσία στους πνευμονικούς ιστούς. Οι δυνατότητές των EVs αυτών για χρήση σε συνδυαστικές θεραπείες ενισχύεται με το γεγονός ότι παράλληλα με την πακλιταξέλη, τα κυστίδια αυτά μπορούν να μεταφέρουν και μόρια siRNA προσδίδοντάς τους φυσική βιοσυμβατότητα [22].

1.3.5.2 EVs από Γκρέιπφρουτ

Χρησιμοποιήθηκαν σε έρευνα EVs προερχόμενα από γκρέιπφρουτ, τα οποία σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να μεταφέρουν φάρμακα χημειοθεραπείας, όπως η δοξορουβικίνη συνδυαστικά με μόρια siRNA, για την θεραπεία του γλοιώματος. Η τροποποίηση των EVs έγινε με την ενσωμάτωση νανοσωματιδίων Dns έχοντας ως βάση την ηπαρίνη, φορτωμένη με χημειοθεραπευτικό φάρμακο. Ο υβριδικός βιομιμητικός σχεδιασμός αυτός, κατάφερε να αξιοποιήσει την στοματική ανοχή και την φυσική βιοσυμβατότητα που προσφέρουν τα EVs φυτικής προέλευσης. Παράλληλα, η διαδικασία αυτή αντιμετώπισε τις καταστάσεις υψηλής συστηματικής τοξικότητας και χαμηλής αποτελεσματικότητας που είχαν προηγουμένως τα φάρμακα αυτά. Το υβρίδιο EVs-Dns που δημιουργήθηκε από τα

γκρέιφρουτ, εμφάνισε παρατεταμένη έκλυση φαρμάκου, και στοχευμένη συσσώρευση σε ιστούς γλοιώματος, ενισχύοντας τις αντικαρκινικές επιδράσεις της δοξορουβικίνης. Παράλληλα, η ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA παρείχε την ιδιότητα να καταστέλλονται συγκεκριμένα γονιδιακά μονοπάτια που έδιναν αντι-θεραπευτικά αποτελέσματα [22],[23].



Εικόνα 11: Νανοςωματίδια φορτωμένα με EVs γκρέιφρουτ που περιέχουν δοξορουβικίνη για τη θεραπεία του γλοιώματος (Πηγή Εικόνας: [24]).

1.3.5.3 EVs από δενδριτικά κύτταρα

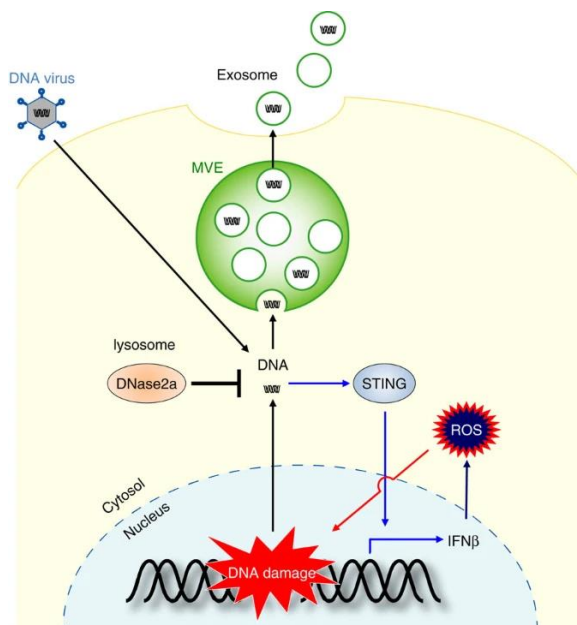
Γενετικά τροποποιημένα EVs προερχόμενα από δενδριτικά κύτταρα, μπορούν να φανούν αποτελεσματικά για την καταπολέμηση καρκίνου του μαστού. Με την τροποποίηση τους, επιτυγχάνεται η έκφραση της Lamp2b πρωτεΐνης, σε συγχώνευση με το πεπτίδιο iRGD το οποίο δεσμεύεται αποκλειστικά σε ιντεγκρίνες οι οποίες με την σειρά τους υπερεκφράζονται σε ιστούς με καρκίνο του μαστού. Το φάρμακο που τοποθετήθηκε σε αυτά τα EVs με την μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς ήταν η δοξορουβικίνη. Η μέθοδος αυτή επέτρεψε να διατηρείται υψηλά η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Σε μελέτες που έγιναν *in vivo*, φάνηκε πως η δοξορουβικίνη παραδίδεται από τα κυστίδια στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 με μεγάλη ακρίβεια, μειώνοντας και τις συστηματικές παρενέργειες. Παράλληλα, το φόρτωμα μορίων siRNA στα κυστίδια αυτά, επιτρέπει την ταυτόχρονη γονιδιακή αποσιώπηση, ενισχύοντας και άλλο τις θεραπευτικές δυνατότητές τους [22],[23].

1.4 Ο ρόλος των εξωσωμάτων

1.4.1 Ο ρόλος των εξωσωμάτων σε φυσιολογικές συνθήκες

Τα εξωσώματα έχουν καίριο ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, αφού με την μεταφορά βιολογικών μορίων (biomolecules) μεταφέρουν σήματα στα κύτταρα. Έτσι, σε φυσιολογικές συνθήκες τα εξωσώματα έχουν συμμετοχή στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού καθώς ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα – στόχους. Σε άλλα επίπεδα ομοιόστασης τα εξωσώματα βοηθάνε στις

ανοσολογικές αντιδράσεις, ενεργοποιώντας τη δημιουργία αντισωμάτων και την αποκατάσταση βλαβών σε ιστούς [25].



Εικόνα 12: Μοντέλο κυτταρικής ομοιόστασης με την χρήση εξωσωμάτων (Πηγή Εικόνας: [26]).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο ρόλος των εξωσωμάτων στην υγεία της καρδιάς, όπου η επικοινωνία των εξωσωμάτων είναι απαραίτητη, αφού τα «καρδιοσώματα» όπως ονομάζονται τα εξωσώματα που προέρχονται από τα καρδιομυοκύτταρα, μεταφέρουν πρωτεΐνες και mRNA που είναι σημαντικές για την σωστή ρύθμιση της λειτουργίας της καρδιάς. Μελέτες έχουν δείξει πως τα γονίδια που περιέχουν συγκεκριμένα καρδιοσώματα εμπλέκονται μέσω της γονιδιακής έκφρασης με την απόκριση του στρες αλλά και στην προσαρμογή του οργανισμού σε φυσιολογικές συνθήκες έπειτα από ισχαιμικές βλάβες [27].

1.4.1.1 Επικοινωνία νευρώνων-ολιγοδενδροκυττάρων μέσω εξωσωμάτων

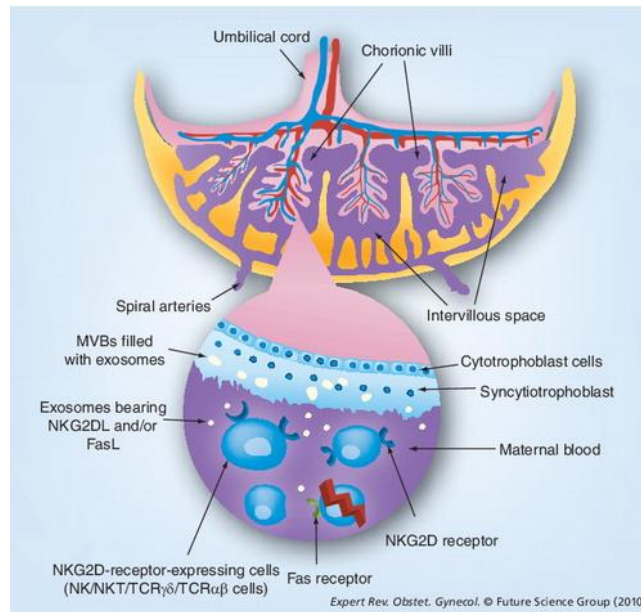
Υπεύθυνα για την παραγωγή μυελίνης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) είναι τα γλοιακά κύτταρα που ονομάζονται ολιγοδενδοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα έχουν κύριο ρόλο στην διατήρηση της υγείας και της λειτουργίας αξόνων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η επικοινωνία των ολιγοδενδοκυττάρων με τους νευρώνες, γίνεται με την απελευθέρωση εξωσωμάτων που περιέχουν μεταβολικά μόρια και μόρια προστασίας. Η δημιουργία των εξωσωμάτων αυτών γίνονται μέσω της πολύπλοκης διαδικασίας που συμμετέχει το σύμπλοκο ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Στην διάρκεια της βιογένεσης, γίνεται ο σχηματισμός των ILVs εντός των πολυκυτταρικών σωμάτων MVBs που εν συνεχεία συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη [27].

Τα εξωσώματα αυτά (ολιγοδενδοκυττάρων) είναι εξατομικευμένα στην παραγωγή ATP αφού διαθέτουν ισχυρό φορτίο γλυκολυτικών ενζύμων όπως για παράδειγμα η GAPDH και η ενολάση. Η ικανότητα τους να μετριάζουν το οξειδωτικό στρες και την λάθος αναδίπλωση πρωτεϊνών, προέρχεται από το γεγονός ότι μεταφέρουν πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως η HSP70. Τα εξωσώματα αυτά επίσης είναι εμπλουτισμένα με ρυθμιστικά μόρια miRNAs όπως τα miR-219 και miR-138 που ελέγχουν την νευρωνική επιβίωση και την αξονική ανάπτυξη. Επίσης, περιέχουν και μόρια mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετικά με την μυελίνη όπως η PLP. Συγκεκριμένα, οι νευρώνες που βρίσκονται λόγω υψηλών μεταβολικών απαιτήσεων υπό πίεση, δίνουν το μήνυμα στα ολιγοδενδροκύτταρα να γίνει η απελευθέρωση των εξωσωμάτων με μηχανισμούς όπως η εισροή ασβεστίου και η γλουταμινεργική συνοπτική ενεργοποίηση. Μετά την απελευθέρωση, τα εξωσώματα εσωτερικεύονται από τους νευρώνες με την διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, και την μεσολάβηση οδών εξαρτώμενων από λιπίδια [28].

1.4.1.2 Διαμόρφωση ανοσοποιητικού συστήματος μέσω εξωσωμάτων πλακούντα κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης

Την περίοδο εγκυμοσύνης, από τον πλακούντα και συγκεκριμένα από την συγκυτιο-τροφοβλαστική στιβάδα, εκκρίνονται ενεργά εξωσώματα στην κυκλοφορία αίματος της μητέρας, που έχουν βασικό ρόλο την εδραίωση της ανοσολογικής ανοχής στο έμβρυο. Τα μόρια που μεταφέρουν τα εξωσώματα του πλακούντα, είναι τα Fas Ligand (Fas L), Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) και Programmed Death Ligand 1 (PD-L1). Από αυτά τα μόρια επάγεται η απόπτωση στα T- λεμφοκύτταρα μητέρας και έτσι καταστέλλεται η ενεργοποίηση των T κυτταροτοξικών κυττάρων, εξασφαλίζοντας έτσι την μητρική ανοσολογική ανοχή [29].

Εν συνεχεία, τα εξωσώματα περιέχουν συνδετικά μόρια NKG2D τα οποία αλληλεπιδρούν με τα NK κύτταρα (Natural Killers) με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι των τροφοβλαστικών κυττάρων. Από τον πλακούντα, τα εξωσώματα μεταφέρουν ρυθμιστικά μόρια miRNAs που ρυθμίζουν κυτταροκινές οι οποίες είναι προφλεγμονώδεις, όπως η IL-6 και ο TNF-α, διατηρώντας έτσι ένα περιβάλλον χωρίς φλεγμονές. Ο ανοσορυθμιστικός ρόλος των εξωσωμάτων αυτών, είναι απαραίτητης σημασίας για να προληφθούν ανοσο-διαμεσολαβούμενες επιπλοκές, όπως η αποβολή και η προεκλαμψία [29].



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου αιμοχωρητικού πλακούντα (Πηγή Εικόνας: [30]).

1.4.1.3 Αγγειογένεση από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) μέσω εξωσωμάτων

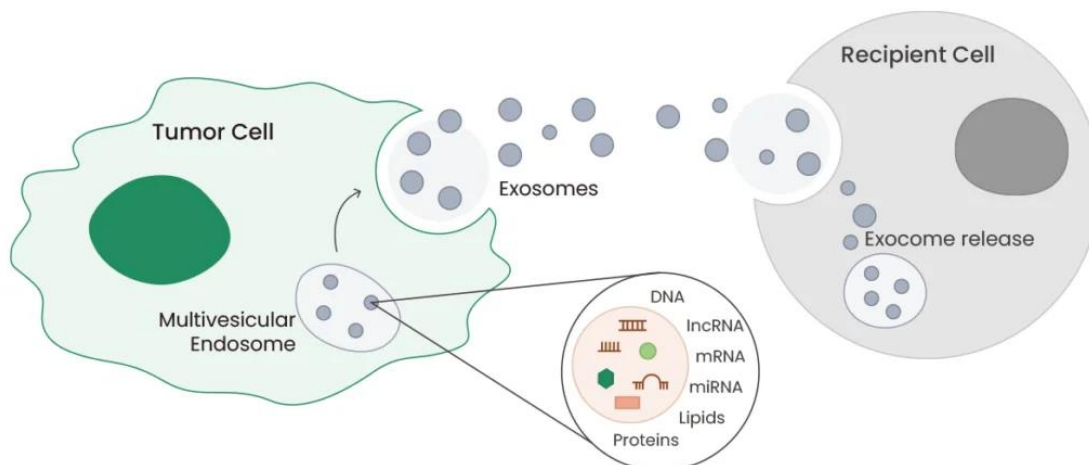
Εξωσώματα εμπλουτισμένα με προ-αγγειογενετικά μόρια, απελευθερώνονται από τα MSCs και προάγουν έτσι την αγγειογένεση. Μερικά από τα μόρια που μεταφέρονται από τα εξωσώματα είναι το Wnt4 που ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, αλλά και ρυθμιστικά μόρια miRNA όπως το miR-125a που αναστέλλει τον Delta – like ligand 4 (DLL4) και έτσι προωθείται ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον σχηματισμό των τελικών κυττάρων [31].

Μέσω της ενδοκυττάρωσης, τα εξωσώματα εσωτερικεύονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και με την μεσολάβηση του υποδοχέα, ενεργοποιούνται μεταγενέστερα μονοπάτια όπως τα PI3K/AKT και MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενίσχυση της επιβίωσης αλλά και για την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι μεταλοπρωτεϊνάσες της μήτρας MMPs (Matrix Metalloproteinases) που μεταφέρονται από τα εξωσώματα των MSC διευκολύνουν την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας, που είναι ένα κρίσιμο βήμα για την εκβλάστηση των τριχοειδών αγγείων. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα ενισχύουν την αγγειακή πυκνότητα, και βελτιώνουν την ιστική αιμάτωση σε μοντέλα ισχαιμίας in vivo. Έτσι αναδεικνύεται ο ρόλος που έχουν για την αποκατάσταση των ιστών σε φυσιολογικές συνθήκες [31].

1.4.2 Εξωσώματα Παθολογικές συνθήκες

Στον καρκίνο, τα εξωσώματα προερχόμενα από ογκοκύτταρα τροποποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, και έτσι βοηθάνε την πρόοδο και την εξάπλωση του καρκίνου, καθώς και την δημιουργία φιλικού περιβάλλοντος ως προς τον καρκίνο. Τα κακοήγη κύτταρα παράγουν εξωσώματα που μεταφέρουν ογκογονικές πρωτεΐνες και ρυθμιστικά μόρια miRNA, καταλύοντας μεταστάσεις καθώς

απενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, στην διάδοση καρκίνου, σημαντικός παράγοντας είναι τα εξωσώματα που περιέχουν και μεταφέρουν ογκογονίδια [32].



Εικόνα 14: Μεταφορά εξωσωμάτων μεταξύ κυττάρων όγκου και κύτταρα δέκτη (Πηγή: [33]).

Τα εξωσώματα επίσης εμπλέκονται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer και η νόσος Parkinson. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εξωσώματα μεταφέρουν τις κακώς – δομημένες πρωτεΐνες όπως η amyloid-beta και η alpha-synuclein μεταξύ των νευρώνων. Αυτός ο μηχανισμός επιδεινώνει την νόσο, και μοιράζει συσσωματώματα τοξικού χαρακτήρα σε όλο το ΚΝΣ αλλά κυρίως στον εγκέφαλο [25].

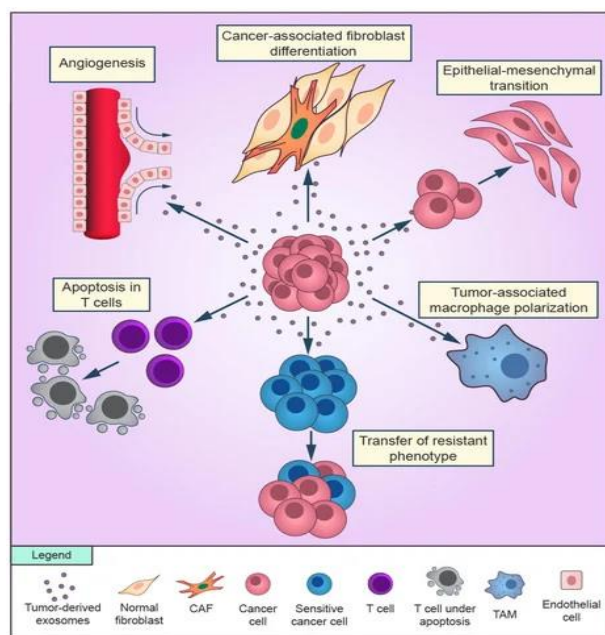
Σχετικά με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, μελέτες έδειξαν ότι τα εξωσώματα έχουν επιβλαβή επιρροή μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από καρδιακά κύτταρα στρεσαρισμένα κατά την διάρκεια ισχαιμικού επεισοδίου, μεταφέρουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες και ινωτικές (με ίνες) πρωτεΐνες, αναδιαμορφώνοντας παθολογικά τον καρδιακό ιστό. Με αυτό το τρόπο, επηρεάζεται ο εξωκυττάριος χώρος και τα εξωσώματα προάγουν επιβλαβείς αλλαγές στην καρδιά [32].

Σχετικά με την εγκυμοσύνη, τα εξωσώματα εμπλέκονται σε μία πάθηση, την προεκλαμψία, που είναι διαταραχή εγκυμονούσης γυναίκας. Σε φυσιολογική εγκυμοσύνη, τα εξωσώματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ρυθμίζουν το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα, και στηρίζουν στην σωστή λειτουργία του πλακούντα. Παρόλα αυτά στην προεκλαμψία, η δυσλειτουργική δραστηριότητα των εξωσωμάτων, οδηγεί τον οργανισμό σε εξασθενημένη αγγειακή λειτουργία. Η εξέλιξη της εγκυμοσύνης μέσα σε αυτήν την παθολογική κατάσταση, οδηγεί σε σοβαρές επιπλοκές που φέρουν σε κίνδυνο τόσο το έμβρυο όσο και την έγκυο γυναίκα [27].

1.4.2.1 Εξωσώματα κατά την πρόοδο του καρκίνου

Μικροπεριβάλλον

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME: Tumor Micro Environment) επηρεάζεται άμεσα από τα εξωσώματα που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ανοσοκυττάρων, αλλά και μεταξύ των ινοβλαστών. Τα ογκοκυτταρικά εξωσώματα μεταφέρουν ανοσοκατασταλτικά μόρια όπως το PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) και η FasL (Fas ligand), τα οποία συνδέονται στον αντίστοιχο υποδοχέα στα T-λεμφοκύτταρα και μηδενίζοντας την κυτταροτοξική αποτελεσματικότητα, οδηγούν στην ανοσοκαταστολή αφού αποφεύγεται η ανίχνευσή τους. Αντιστοίχως συμβαίνει και με το μόριο TGF- β (Transforming Growth Factor β) αλλά με την επιπλέον λειτουργία ότι ο TGF- β μετατρέπει φαινοτυπικά ινοβλάστες σε Μυο-ινοβλάστες, ενισχύοντας έτσι την καρκινική πρόοδο. Επίσης, εξωσώματα κυττάρων μελανώματος, φαίνεται να επάγουν απόπτωση στα CD8⁺ T- λεμφοκύτταρα, αποδυναμώνοντας επιπλέον τους μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης στον οργανισμό. Πέραν του μελανώματος, η ανοσοτροποποιητική λειτουργία των εξωσωμάτων είναι εξαιρετικά αισθητή σε όγκους παχέος εντέρου και παγκρέατος που η δημιουργία ενός TME είναι καθοριστικής σημασίας [34], [35].



Εικόνα 15: Επισκόπηση του ρόλου των καρκινικών εξωσωμάτων στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Πηγή Εικόνας: [36]).

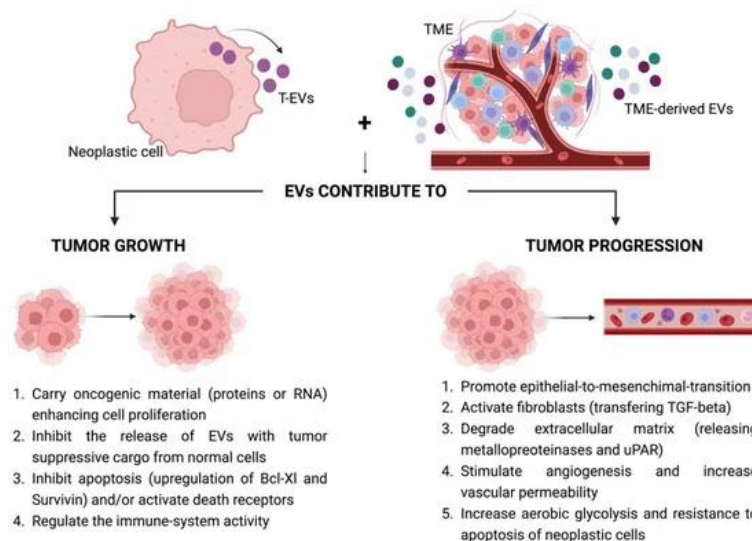
Αγγειογένεση

Κρίσιμος παράγοντας στην ανάπτυξη των όγκων είναι τα εξωσώματα που μεταφέρουν προ-αγγειογενετικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του VEGF (ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας: Vascular Endothelial Growth Factor) και των ρυθμιστικών μορίων miRNAs όπως το miR-

210. Η δράση των παραγόντων αυτών γίνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα με σκοπό να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό, την μετατόπιση αλλά και την αλλαγή τους σε σωληνοειδείς δομές για να σχηματιστούν νέα αιμοφόρα αγγεία. Έρευνες έχουν δείξει πως τα εξωσώματα προερχόμενα από όγκους στον μαστό βελτιώνουν την μετατόπιση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την σωληνοποίηση τους *in vitro*. Στοιχεία επίσης αποδεικνύουν ότι η *in vitro* αγγείωση, σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη μεταστάσεων, καθιστώντας τα εξωσώματα, παράγοντα στην αγγειογένεση των όγκων [37], [38]

Αντίσταση σε Φάρμακα

Τα εξωσώματα στον καρκίνο, ευνοούν την ανθεκτικότητα σε φάρμακα μέσω της οριζόντιας μεταφοράς μορίων συσχετιζόμενα με την ανθεκτικότητα όπως τα DEF (Drug Efflux Pumps) και ρυθμιστικών μορίων miRNAs που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό φαρμακευτικών ουσιών. Για παράδειγμα, αντίσταση στα φάρμακα προσδίδει η μεταφορά της P-γλυκοπρωτεΐνης μέσω εξωσωμάτων. Επιπλέον, κάποια miRNAs έχουν την δυνατότητα να καταστείλουν γονίδια για την ευαισθησία σε φάρμακα, επιτρέποντας έτσι την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων παρά την χρήση χημειοθεραπειών. Σε καρκίνο των ωοθηκών, τα εξωσώματα έχουν δείξει ότι εμπλέκονται σε έναν κύκλο ανάδρασης που ενδυναμώνει τους μηχανισμούς αντίστασης, γεγονός που δείχνει τον ρόλο τους στην πολυσύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος. Με αυτόν τον τρόπο τονίζεται η ανάγκη για θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν ως σκοπό την επικοινωνία εξωσωμάτων σε πιθανή λύση για την αντίσταση σε φάρμακα [39], [40].



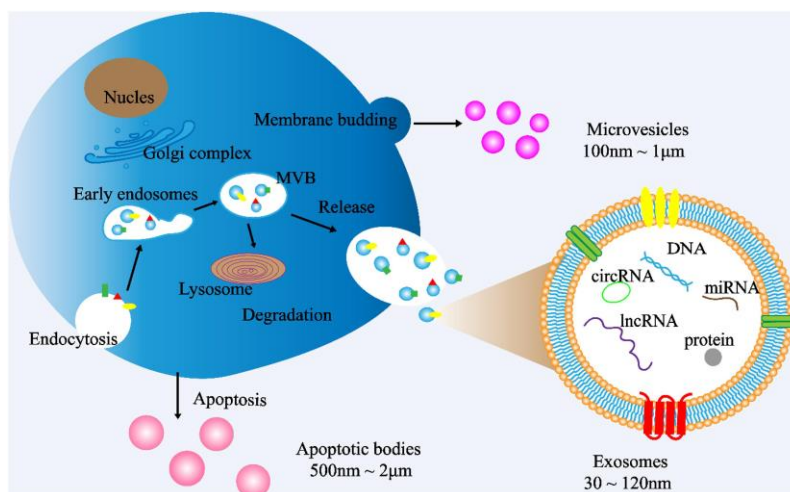
Εικόνα 16: Μηχανισμοί με τη μεσολάβηση EVs προερχόμενων από τον όγκο και EVs προερχόμενων από τα στρωματικά κύτταρα που προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου (Πηγή Εικόνας: [41]).

1.4.2.2 Εξωσώματα κατά την μετάσταση

Στην μετάσταση καρκινικών κυττάρων, τα εξωσώματα συμβάλλουν στο να τροποποιούν το περιβάλλον απομονωμένων ιστών με σκοπό να διευκολύνεται ο αποικισμός καρκινικών κυττάρων. Το μεταφερόμενο φορτίο, που μπορεί να περιλαμβάνει πρωτεΐνες, mRNAs και miRNAs, διαμορφώνει τα όργανα-στόχους σε προμεταστατικές θέσεις που ευνοούν την εγκατάσταση των ογκοκυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, τα εξωσώματα υψηλού μεταστατικού επιπέδου προερχόμενα από μελανώματα, τα οποία αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων με σκοπό να προσελκύσουν κύτταρα μυελού των οστών στις περιοχές στόχους και να αυξηθεί το μεταστατικό δυναμικό. Η ικανότητα αλλοίωσης του μικροπεριβάλλοντος, πέρα του ότι επισημαίνει τον ρόλο των εξωσωμάτων στην μετάσταση, υποδεικνύει και την δυνατότητα τους για θεραπευτικούς σκοπούς στην μεταστατική διαδικασία [42].

Οστικές μεταστάσεις και καρκίνος του προστάτη

Έρευνες έχουν δείξει πως εξωσώματα που έχουν παραχθεί από καρκινικά κύτταρα του προστάτη βοηθούν στη μεταφορά στοιχείων που παίζουν ρόλο στη μετάσταση του όγκου στα οστά. Συγκεκριμένα, τα εξωσώματα αυτά είναι πλούσια σε συγκεκριμένα ρυθμιστικά μόρια miRNAs όπως τα miR-409 και miR-141 που συμμετέχουν στην προώθηση της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης, έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς κυτταρικής διασποράς. Τα ογκοκατασταλτικά συστατικά που φέρουν τα εξωσώματα σαν τον SHP, στοχεύονται από το miR-409 και προκαλούν αλλαγές στο οστικό μικροπεριβάλλον. Σε ορούς ασθενών με μεταστατικό προστατικό καρκίνο, έχουν βρεθεί τα συγκεκριμένα miRNA, υποδεικνύοντας τον ρόλο των εξωσωμάτων ως πιθανούς βιοδείκτες. Με την αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος από τα εξωσώματα, τα τοπικά στρωματικά κύτταρα, επάγουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση και έτσι σχηματίζονται αλλοιώσεις τόσο οστεολυτικές αλλά και οστεοβλαστικές, χαρακτηρίζοντας την οστική μετάσταση [43].



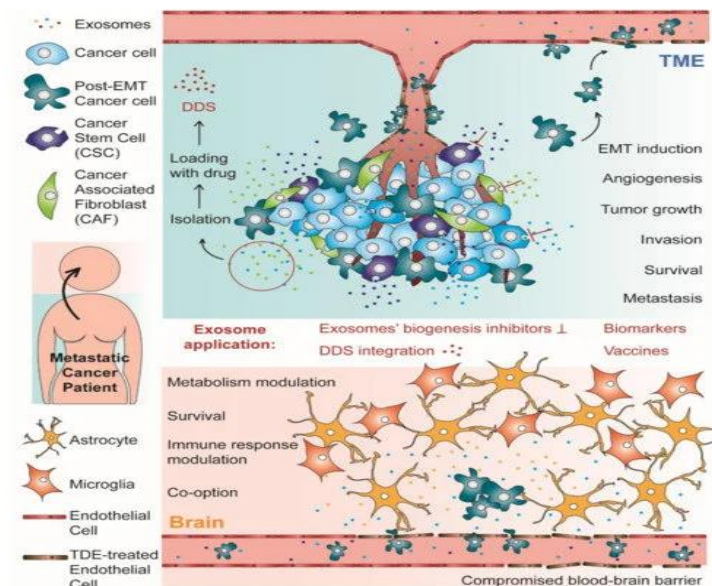
Εικόνα 17: Τα βασικότερα είδη EVs και πως γίνεται η απελευθέρωσή τους από το κύτταρο (Πηγή Εικόνας: [44]).

Μελάνωμα και φρουρός λεμφαδένας

Τα εξωσώματα από τα κύτταρα μελανώματος, παίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία των φρουρών λεμφαδένων, οι οποίοι αποτελούν κρίσιμο σημείο στην περιοχή αυτή για τον μεταστατικό αποικισμό. Από τους φρουρούς λεμφαδένες επάγεται μια αλυσίδα γεγονότων και πιο συγκεκριμένα, αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), της αγγειογένεσης, της ανοσοκαταστολής και την πρόσληψη κυττάρων – υποστηρικτών όπως είναι τα κατασταλτικά κύτταρα που προέρχονται από μυελοειδή (MDSC). Γονίδια σαν αυτά που μεταφράζουν και κωδικοποιούν την σταθερίνη 1, που είναι ο υποδοχέας β4 της εφρίνης και της βιτρονεκτίνης, έχουν μεγάλο ρόλο εμπλοκής στην προσκόλληση κυττάρων του μελανώματος. Το γεγονός της αναδιαμόρφωσης της ECM υποστηρίζεται επιπλέον και από την αυξανόμενη έκφραση παραγόντων όπως η λαμίνη-5, η uρα και το κολλαγόνο 18, που κάνουν την παγίδευση των κυττάρων μελανώματος στους λεμφαδένες πιο εύκολη. Συγχρόνως, γίνεται ενεργοποίηση στα αγγειογενετικά μονοπάτια μέσω του VEGF καθοδηγούμενη από τον υποξιακά επαγόμενο παράγοντα-1α (HIF1α). Η πολυδιάσταση διάδραση αυτή κάνει τους φρουρούς λεμφαδένες μεταστατικούς κόμβους, που είναι συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μελανώματος [45].

Καρκίνος μαστού και μετάσταση στον εγκέφαλο

Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκκρίνουν εξωσώματα που επηρεάζουν την αλλαγή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood Brain Barrier BBB), επιτρέποντας την εγκεφαλική μετάσταση. Τα εξωσώματα αυτά περιέχουν σύνθετο φορτίο από miRNA, αυξητικούς παράγοντες σαν την αμφιρεγουλίνη και πρωτεΐνες, που ενισχύουν την σηματοδότηση του EGFR. Τα εξωσώματα που εκφράζουν την αμφιρεγουλίνη αυξάνουν την ικανότητα εισχωρητικότητας καρκινικών κυττάρων του μαστού σε σχέση με άλλους συνδέτες σαν την TGFα. Επιπροσθέτως, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB τροποποιούνται από τα εξωσώματα αυτά και προκαλούν αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας διευκολύνοντας την εκθήλυνση καρκινικών κυττάρων στους ιστούς του εγκεφάλου. Με την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών του EGFR, ο μεταστατικός αποικισμός προωθείται επιπλέον. Συμπερασματικά, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκμεταλλεύονται τις ξεχωριστές ιδιότητες των εξωσωμάτων και ξεπερνάνε τους φυσικούς φραγμούς του BBB εγκαθιστώντας μεταστατικούς όγκους στον εγκέφαλο [45], [46].



Εικόνα 18: Αναπαράσταση των σταδίων διαδικασίας σχηματισμού μεταστάσεων με υποτροπισμό στον εγκέφαλο: το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) και η προμεταστατική κόγχη (PMN) που γίνεται η μεταστατική εγκατάσταση (Πηγή Εικόνας: [47]).

Βιοδείκτες

Η χρησιμότητα των εξωσωμάτων σαν βιοδείκτες στην καρκινική διάγνωση, αναδεικνύεται από την ικανότητά τους, να ενσωματώνουν λιπίδια, πρωτεΐνες, και νουκλεϊκά οξέα, εξειδικευμένα για τον όγκο. Η παρουσία τους σε σωματικά υγρά όπως πλάσμα και ούρα επιτρέπει να γίνεται δειγματοληψία άνευ επεμβάσεως, γεγονός που δίνει μια πρακτική προσέγγιση στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, και εάν υπάρχει ανταπόκριση στην θεραπεία. Τα εξωσώματα, αντανακλούν μοριακά την υπογραφή του μητρικού όγκου, και έτσι μπορεί να γίνει έγκαιρη ανίχνευση της κακοήθειας. Ένα από τα παραδείγματα που έχουν δείξει έρευνες είναι πως ασθενείς με κακοήγη όγκο σε πάγκρεας, φέρουν στα εξωσώματά τους συγκεκριμένα miRNAs και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το στάδιο του όγκου [34], [35].

Πολλαπλασιασμός Κυττάρων

Το σύνολο του εξωσωματικού φορτίου που περιέχει ογκογόνα miRNAs, αυξητικούς παράγοντες, και πρωτεΐνες – δείκτες, επηρεάζει την συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων στον αποδέκτη προωθώντας τον πολλαπλασιασμό. Εξωσώματα από κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC: Hepatocellular Carcinoma) μεταφέρουν το ρυθμιστικό μόριο miR-21 που έχει ως στόχο τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενισχύοντας έτσι την κυτταρική διαίρεση. Τα ογκογόνα σήματα, αυξάνουν τα καρκινικά κύτταρα και επαναπρογραμματίζουν τα φυσιολογικά στρωματικά κύτταρα, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη όγκου και την εξέλιξη του καρκινώματος. Αυτά τα μονοπάτια επικοινωνίας είναι αναγκαίο να διακοπούν μέσω στοχευμένων θεραπειών [34].

Στόχευση Εξωσωμάτων για την θεραπεία.

Έχοντας ως δεδομένο τον πολύπλευρο ρόλο των εξωσωμάτων στην εξέλιξη του καρκίνου, αυτά έχουν καταστεί κύριοι στόχοι για την θεραπευτική παρέμβαση. Η παρέμβαση αυτή περιλαμβάνει την αναστολή της παραγωγής τους ή την διατάραξη του φορτίου τους για την άμβλυνση των ογκογονικών επιπτώσεών τους. Για παράδειγμα, φαρμακευτικοί παράγοντες σαν τον GW4869 που αναστέλλουν την ουδέτερη σφινγομυελινάση (neutral sphingomyelinase) έχουν δείξει ότι με την χορήγησή τους μειώνουν την έκκριση των εξωσωμάτων και συνεπώς δυσχεραίνεται το ογκολογικό περιβάλλον. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι η κατανόηση της βιολογίας των εξωσωμάτων είναι αναγκαία για την βελτίωση της καρκινικής θεραπείας [34], [48].

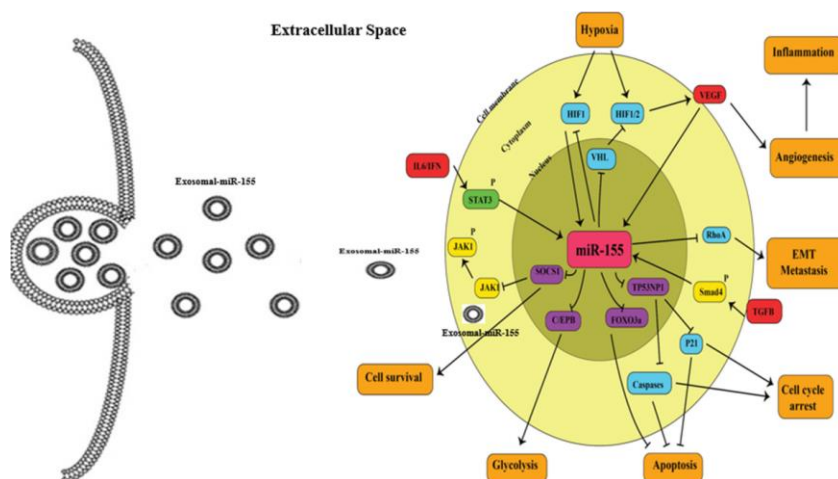
Φλεγμονή και καρκίνος

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής διευκολύνουν την εξέλιξή του. Τα εξωσώματα μεταφέρουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-6 και TNF-α, οι οποίες ενεργοποιούν τα ανοσοκύτταρα του ιστού και προκαλούν μια συνεχή φλεγμονή που υποστηρίζει την ανάπτυξη του όγκου. Στο παράδειγμα με την κακοήθεια του παχέος εντέρου, τα miRNAs που μεταφέρονται είναι φλεγμονώδη και διαμορφώνουν το πως δραστηριοποιούνται τα ανοσοκύτταρα [49].

1.4.3 Εξωσώματα ως ρυθμιστές στην ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου

Τα εξωσώματα που φέρουν miRNA

Καίριος ρυθμιστικός ρόλος των εξωσωμάτων είναι η μεταφορά ρυθμιστικών μορίων miRNA που δρουν ως ρυθμιστές ανοσολογικής απόκρισης. Ένα παράδειγμα είναι το μόριο miR-155 που αποδεδειγμένα έχει κρίσιμο ρόλο στο πως διαμορφώνεται η συμπεριφορά των ανοσοκυττάρων και κυρίως στο πως ενισχύεται η ωρίμανση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Αυτό το μόριο miRNA έχει επίδραση στην έκφραση γονιδίων που ευθύνονται για την διαφοροποίηση ανοσοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την κινητοποίηση προφλεγμονωδών δρόμων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το miR-155 ρυθμίζει τον μεταγραφικό μηχανισμό για τις ανοσολογικές αντιδράσεις, αφού μορφοποιεί κατάλληλα τα T- λεμφοκύτταρα. Τα εξωσωματικά miRNAs μπορούν επίσης και να καταστέλλουν την φλεγμονή αφού έχουν ως στόχο mRNA που μεταγράφονται για την παραγωγή κυτταροκινών [49].



Εικόνα 19: Διάφοροι μηχανισμοί που μπορούν να επηρεαστούν από το miRNA-155 και το εξωσωματικό miR-155 (Πηγή εικόνας: [50]).

Εξωσωματικό DNA για εκκινητής της ανοσολογικής απόκρισης (έμφυτης)

Αρκετά μεγάλος αριθμός εξωσωμάτων, πέρα από RNA φέρουν ποσότητες DNA, οι οποίες είναι αρμόδιες για την πυροδότηση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, τα εξωσώματα που περιέχουν DNA είτε γονιδιωματικό είτε μιτοχονδριακό, θέτουν σε ενεργοποίηση το μονοπάτι της κυκλικής GMP-AMP που είναι διεγέρτης των γονιδίων ιντερφερόνης cGAS-STING. Έτσι ξεκινάνε να παράγονται ιντερφερόνες τύπου 1 και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που θεωρούνται βασικά συστατικά για την άμυνα ενός οργανισμού εναντίων βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων. Ο σημαντικός ρόλος του εξωσωματικού DNA για την ανοσολογική απόκριση αναδεικνύεται από την ιδιότητα του να εκλύεται σε στρεσογόνες συνθήκες όπως στην διάρκεια μιας ιστικής λοίμωξης [51].

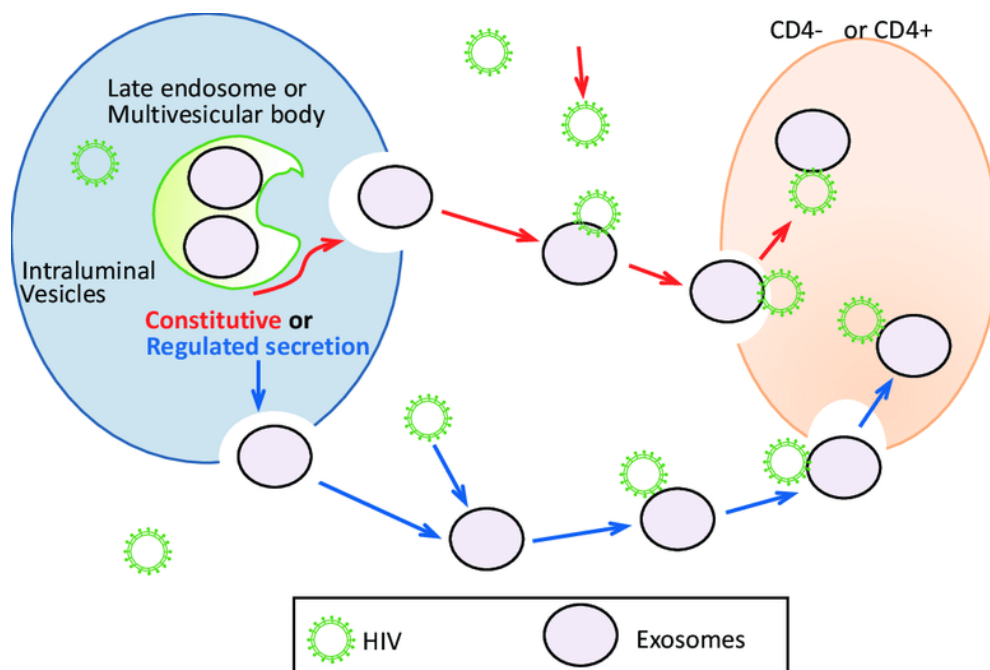
Ρόλος εξωσωμάτων στην ρύθμιση ιογενών λοιμώξεων

Σε ιογενείς λοιμώξεις, τα εξωσώματα εμπλέκονται στην ρύθμιση των ανοσολογικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, είναι φορείς ιϊκών συστατικών όπως RNA ιών, πρωτεϊνών, και κάνουν ευκολότερη την εξάπλωση λοιμώξεων, μεταφέροντας τα υλικά αυτά μεταξύ των κυττάρων – ξενιστών. Στη διάρκεια μιας λοίμωξης από τον HIV για παράδειγμα, εξωσώματα μεταφέρουν ιϊκής προέλευσης πρωτεΐνες όπως η Nef που ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση με την μείωση έκφρασης του γονιδίου CD4 στα T-λεμφοκύτταρα [52].

• Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

Τα εξωσώματα στην λοίμωξη HIV δρουν σαν βασικοί διευκολυντές για την διάδοση του ιού και την ανοσολογική αποφυγή. Η οδός βιογένεσης των εξωσωμάτων χρησιμοποιείται από τον HIV για να

ενισχύσει τις δεξιότητές του στη μετάδοση στα κύτταρα του ξενιστή. Η ιϊκή πρωτεΐνη Nef που βρίσκεται στα εξωσώματα προερχόμενα από μολυσμένα κύτταρα από τον HIV, κατέχει κρίσιμο ρόλο για την προώθηση του ιϊκού πολλαπλασιασμού όπως προ-αναφέρθηκε, και την διαμόρφωση της ανοσίας στον ξενιστή. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα, αυξάνουν το πλήθος των MVBs και επιφέρουν απόπτωση σε CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, αλλάζοντας έτσι τις οδούς σήμανσης εντός του κυττάρου. Με αυτόν τον τρόπο εξαντλούνται τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, γεγονός που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα για την παθογένεια του AIDS. Η Nef πρωτεΐνη εκτός κυττάρου απορυθμίζει το CD4 και το MHC-1 στα κύτταρα του δέκτη, διαταράσσοντας την ανοσολογική επιτήρηση. Τα εξωσώματα, μεταφέρουν επιπλέον το ρυθμιστικό μόριο miRNA του στοιχείου απόκρισης δια-ενεργοποίησης (TAR) το οποίο παρεμβαίνει στην απόπτωση των κυττάρων του αποδέκτη, επάγοντας την μείωση στα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bim και Cdk9. Η αντι-αποπτωτική επίδραση αυτή, δίνει παράταση στην διάρκεια ζωής μολυσματικών κυττάρων, κάνοντας επιτρεπτή την αποτελεσματικότερη, αντιγραφή και εξάπλωση του ιού. Τέλος, τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν, γενετικό υλικό του ιού σε άλλα κύτταρα, κάνοντας εύκολη την μόλυνση με διαδικασίες ανεξάρτητες από υποδοχείς, διερευνώντας το φάσμα πιθανών κυττάρων-ξενιστών [52], [53].

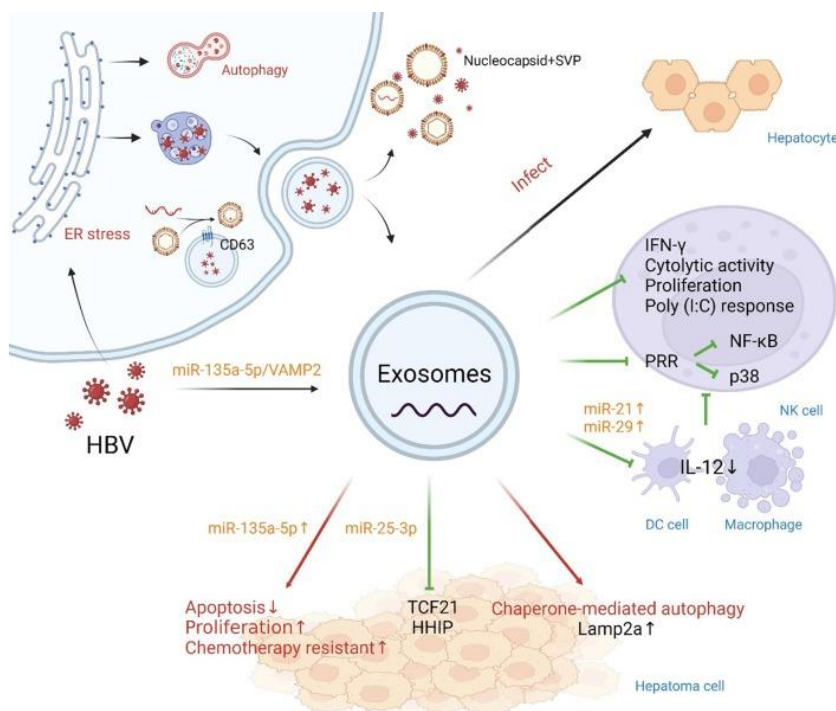


Εικόνα 20: Προτεινόμενοι μηχανισμοί έκκρισης εξωσωμάτων και αλληλεπίδρασης με τον HIV-1 (Πηγή Εικόνας: [54]).

- *Ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV)*

Στην λοίμωξη από τον ιό HBV, τα εξωσώματα δρουν ως φορείς των ιϊκών συστατικών και ως ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Ο ρόλος που έχουν είναι διπλός όπως και στη περίπτωση του HIV, και για την προώθηση της ιϊκής μόλυνσης και για τον επηρεασμό της δυναμικής

ανοσοποιητικού συστήματος. Τα εξωσώματα, προερχόμενα από ηπατοκύτταρα τα οποία είναι μολυσμένα από τον ιό HBV έχουν υψηλά επίπεδα HBV DNA, RNA, πρωτεϊνών, σαν το αντιγόνο της ηπατίτιδας B (HBsAg) και το e-αντιγόνο της ηπατίτιδας B (HBeAg). Αυτά τα συστατικά έχουν την ικανότητα να επάγουν την ενεργή λοίμωξη των ηπατοκυττάρων, κάνοντας την διάδοση του ιού ευκολότερη. Τα HBV – θετικά εξωσώματα θα αντιδράσουν με κύτταρα φυσικών φονέων (Natural Killer NK) και θα αναστείλουν τις κρίσιμες οδούς σήμανσης ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των NF-κB και p38 MAPK, οδηγώντας στην μειωμένη λειτουργικότητα κυττάρων ανοσοποιητικού συστήματος και ελαχιστοποίησης της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Με την ανοσοκαταστολή αυτή, επιτρέπεται στον ιό HBV να παρακάμπτει άμυνες ξενιστή και να εδραιώνονται χρόνιες λοιμώξεις. Ρυθμιστικά μόρια miRNAs όπως το HBV-miR-3, πέρα του γεγονότος ότι δρουν άμεσα για την αναστολή αντιγραφής του HBV, ενισχύουν επίσης την αντι-ϊκή ανοσολογική απόκριση ξενιστή με την έναρξη κινητοποίησης της οδού σηματοδότησης JAK/STAT. Μια άλλη ιδιότητα των εξωσωμάτων είναι και η λειτουργία τους ως ανοσολογικά δολώματα που παρεμβαίνουν στις προστατευτικές ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως η δράση της HbsAb, με την συνδιαμόρφωση μονοπατιών, όπως οι αλληλεπιδράσεις CD81+ κυστιδίων [53].



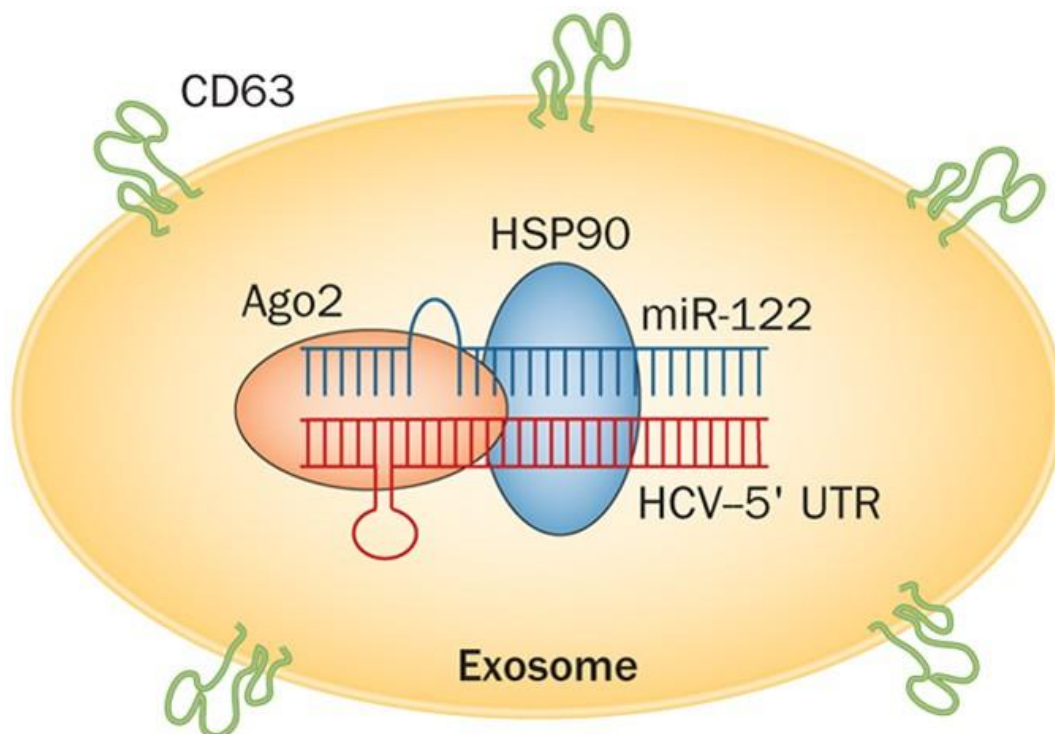
Εικόνα 21: Ο HBV μπορεί να εξαπλωθεί και να προωθήσει την ανάπτυξη της νόσου μέσω εξωσωμάτων (Πηγή Εικόνας: [55]).

- *Ιός της Ηπατίτιδας C (HCV)*

Σε περίπτωση λοίμωξης από τον ιό HCV, τα εξωσώματα συμβάλλουν στην ικανότητα του ιού να μπορεί να παρακάμψει την ανοσία και να προκαλεί χρόνιες λοιμώξεις. Μολυσμένα ηπατοκύτταρα από HCV, απελευθερώνουν εξωσώματα, με ιϊκό RNA και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων δομικών και μη δομικών συστατικών, ζωτικής σημασίας για τον κύκλο ζωής του ιού. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα επιτρέπουν την μόλυνση ηπατοκυττάρων, δίνοντας το ελεύθερο στον ιό να παρακάμψει τους κλασσικούς μηχανισμούς εισόδου. Το RNA του HCV προστατεύεται από το περιβάλλον των εξωσωμάτων, εναντίον των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, κάνοντας έτσι ευκολότερη την παραμονή του εντός του ξενιστή. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα περιέχουν σταθεροποιητικούς παράγοντες, σαν το Ago2 και τον HSP90 και το miRNA-122, οι οποίοι υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό του HCV RNA. Η ιϊκή γλυκοπρωτεΐνη E2 που είναι βασικό για την μόλυνση, εκκρίνεται σε εξωσώματα μέσω του μηχανισμού που ρυθμίζεται από συντενίνη. Με αυτόν τον τρόπο που εκκρίνονται, αποφεύγεται η εξουδετέρωση των αντισωμάτων, αλλά διατηρείται το ποσοστό μολυσματικότητας των ιϊκών, σωματιδίων ιδίως κατά τις χρόνιες φάσεις νόσου. Τα εξωσωμικά συστατικά miR-19a και miR-122 μπορούν να στοχεύουν τα κύτταρα αστεροειδή (HSC) προκαλώντας την ίνωση μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών σαν την σηματοδότηση TGF-β. Με τις διαδράσεις μεταξύ εξωσωμάτων HCV και κυττάρων ξενιστή καταδεικνύεται ο διπλός ρόλος τους στην επιβίωση του ιού και στην συμβολή τους στα παθολογικά αποτελέσματα λοίμωξης από τον HCV όπως είναι η ίνωση του ήπατος και η ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [53].

Εικόνα

22:



Εξώσωμα μολυσμένο με HCV (Πηγή Εικόνας: [56]).

1.4.3.1 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στη ρύθμιση σε αυτοάνοσες αντιδράσεις, και στην ανοσολογική ανοχή

Τα εξωσώματα είναι σημαντικοί συντελεστές για την διαφύλαξη της σωστής λειτουργίας του ανοσοποιητικού και την ρύθμιση της αυτοανοσίας. Στην κατάσταση των αυτοάνοσων νοσημάτων, τα εξωσώματα είτε καταστέλλουν είτε προωθούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Για παράδειγμα, στην ασθένεια του θυρεοειδούς όπως η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, τα εξωσώματα που μεταφέρουν FasL προκαλούν την απόπτωση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων μέσω των αλληλεπιδράσεων με τη Fas/FasL [52].

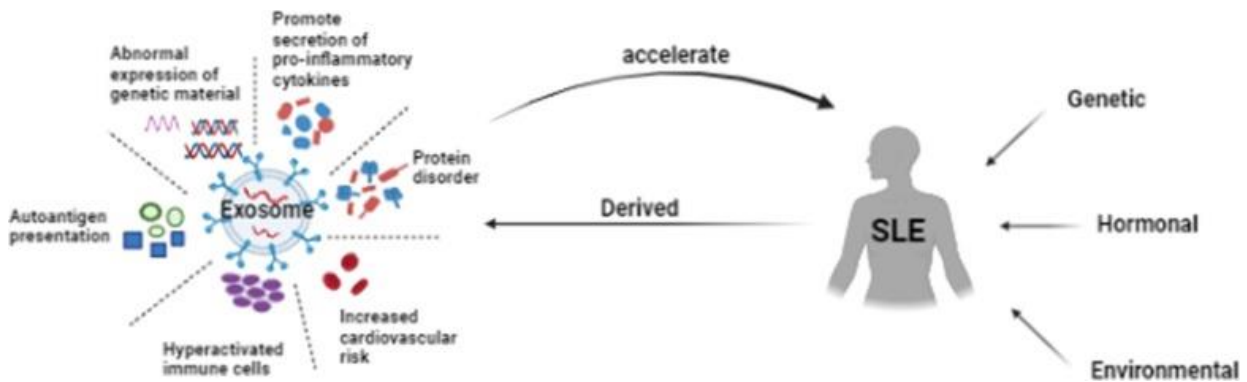
Εξωσώματα στην θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT)

Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) είναι η βασικότερη αιτία υποθυρεοειδισμού, η οποία χαρακτηρίζεται από την λεμφοκυτταρική διήθηση, και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, που έχουν ως στόχο αντιγόνα ειδικευμένα για τον θυρεοειδή, όπως για παράδειγμα η θυρεοσφαιρίνη (Tg) και η θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO). Στην ανοσολογική δυσλειτουργία, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα εξωσώματα που προέρχονται από τα θυρεοειδικά θυλακικά κύτταρα και συγκεκριμένα μετά από την διέγερση της ιντερφερόνης γάμμα (IFN- γ). Τα εξωσώματα αυτά είναι εμπλουτισμένα σε φλεγμονώδης πρωτεΐνες HSP60 και HSP70. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη HSP60 συνδέεται με τον υποδοχέα 2 (TLR2) στα δενδριτικά κύτταρα, διευκολύνοντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF- κ B. Με αυτή την αλληλεπίδραση, γίνεται ενίσχυση των κοστο-ρυθμιστικών μορίων, CD40 και CD80 και των κυτταροκινών όπως για παράδειγμα των IL-6 και TNF- α στα δενδριτικά κύτταρα προωθώντας έτσι την ωρίμανση τους. Εν συνεχεία, τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα, καθοδηγούν την διαφοροποίηση των T-βοηθητικών κυττάρων, στρέφοντας την ισορροπία στα Th1 και Th17 φλεγμονώδη κύτταρα, μειώνοντας τους πληθυσμούς των Treg κυττάρων. Αυτό οδηγεί στην απόπτωση των θυρεοκυττάρων, και στη δημιουργία φλεγμονής στον ιστό. Η αυτοανοσία μπορεί να επιδεινωθεί επίσης, καθώς υπάρχει μεγάλη δομική ομοιότητα μεταξύ της HSP60 και των θυρεοειδικών αντιγόνων, και έτσι προκαλείται η αντίδραση αντιγόνου και αντισώματος. Η ικανότητα αυτή των εξωσωμάτων από τα θυλακικά κύτταρα του θυρεοειδή, να ενεργοποιούν τα ανοσοκύτταρα, υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της HT [57].

Εξωσώματα στον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ)

Ο ΣΕΛ είναι μία πολυπαραγοντική αυτοάνοση νόσος που συνεπάγεται εκτεταμένη φλεγμονή και βλάβη πολλών οργάνων. Στην ΣΕΛ, τα εξωσώματα έχουν τον ρόλο και της κινητήριας δύναμης και των βιοδεικτών. Σε ασθενείς, τα εξωσώματα που προέρχονται από το πλάσμα, είναι εμπλουτισμένα με

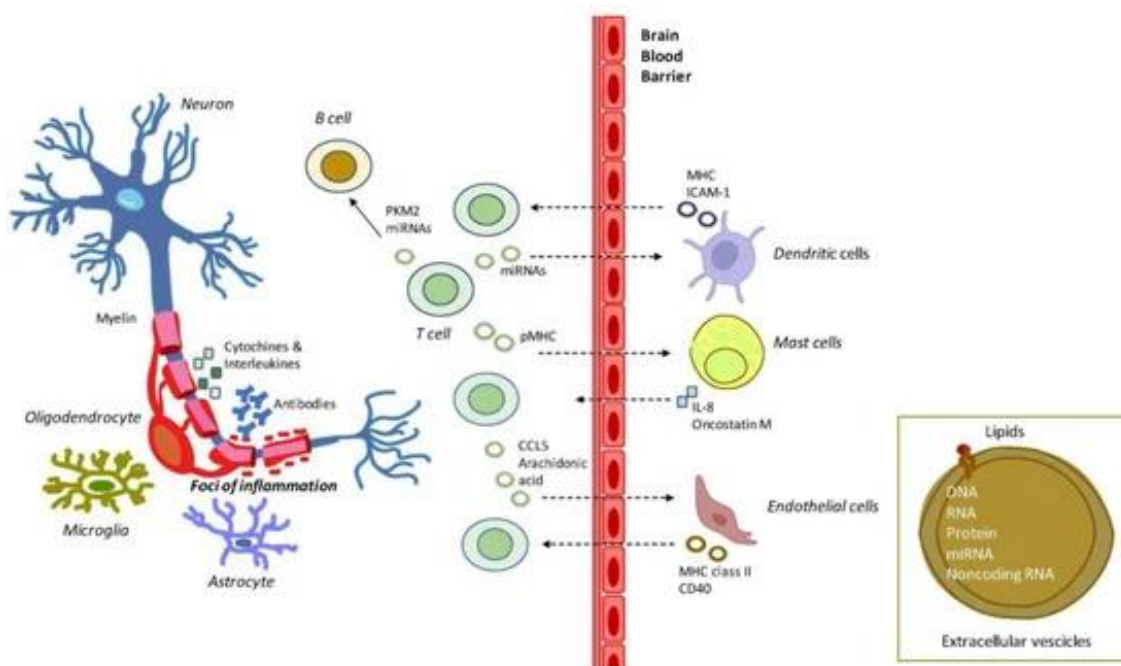
miRNAs (miR-21, miR-574) που δραστηριοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα του πλάσματος, με την σηματοδότηση του TLR7. Έτσι προκαλείται έντονη παραγωγή ιντερφερόνης α (INF- α), η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την ανοσολογική ενεργοποίηση στον ΣΕΛ. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα, φέρουν ένα αλλοιωμένο φορτίο μεμβρανικών πρωτεϊνών, που είναι κυρίως μιτοχονδριακές και αιμοπεταλιακές, αλλά και περιλαμβάνουν αυξημένες γλυκοκλιτικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, που ενισχύουν τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις. Μια σοβαρή επιπλοκή του ΣΕΛ είναι η νεφρίτιδα, κατά την οποία τα εξωσώματα στα ούρα έχουν βρεθεί να περιέχουν miRNAs που ρυθμίζουν οδούς σχετικές με την ίνωση και την βλάβη των ποδοκυττάρων. Συγκεκριμένα, το αυξημένο miR-21 συμβάλει στην νεφρική ίνωση που ρυθμίζουν τις δραστηριότητες των T-λεμφοκυττάρων, προωθώντας την παραγωγή από φλεγμονώδης κυτταροκίνες, και το μειωμένο miR-29c προκαλεί βλάβη στους νεφρικούς ιστούς. Σε ασθενής με ΣΕΛ, τα εξωσώματα διεγείρουν τα Ο ΣΕΛ είναι μία πολυπαραγοντική αυτοάνοση νόσος που συνεπάγεται εκτεταμένη φλεγμονή και βλάβη πολλών οργάνων. Στην ΣΕΛ, τα εξωσώματα έχουν τον ρόλο και της κινητήριας δύναμης και των βιοδεικτών. Σε ασθενείς, τα εξωσώματα που προέρχονται από το πλάσμα, είναι εμπλουτισμένα με miRNAs (miR-21, miR-574) που δραστηριοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα του πλάσματος, με την σηματοδότηση του TLR7. Έτσι προκαλείται έντονη παραγωγή ιντερφερόνης α (INF- α), η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την ανοσολογική ενεργοποίηση στον ΣΕΛ. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα, φέρουν ένα αλλοιωμένο φορτίο μεμβρανικών πρωτεϊνών, που είναι κυρίως μιτοχονδριακές και αιμοπεταλιακές, αλλά και περιλαμβάνουν αυξημένες γλυκοκλιτικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, που ενισχύουν τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις. Μια σοβαρή επιπλοκή του ΣΕΛ είναι η νεφρίτιδα, κατά την οποία τα εξωσώματα στα ούρα έχουν βρεθεί να περιέχουν miRNAs που ρυθμίζουν οδούς σχετικές με την ίνωση και την βλάβη των ποδοκυττάρων. Συγκεκριμένα, το αυξημένο miR-21 συμβάλει στην νεφρική ίνωση που ρυθμίζουν τις δραστηριότητες των T-λεμφοκυττάρων, προωθώντας την παραγωγή από φλεγμονώδης κυτταροκίνες, και το μειωμένο miR-29c προκαλεί βλάβη στους νεφρικούς ιστούς. Σε ασθενής με ΣΕΛ, τα εξωσώματα διεγείρουν τα μονοκύτταρα να εκκρίνουν, TNF- α , IL-1 β και IL-6 και να βοηθήσουν στην διατήρηση της φλεγμονής στο περιβάλλον. Η ποικιλία έκφρασης των miRNAs στα εξωσώματα, μας δείχνει την δυνατότητα τους να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση και την πρόγνωση της νόσου ΣΕΛ [58].



Εικόνα 23: Η επίδραση των εξωσωμάτων που προέρχονται από ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, στην εξέλιξη της νόσου (Πηγή Εικόνας: [59]).

Εξωσώματα στην πολλαπλή σκλήρυνση (MS)

Η Πολλαπλή σκλήρυνση είναι μια αυτοάνοση ασθένεια, που έχει ως στόχο το ΚΝΣ. Τα εξωσώματα από τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, (MSC-Exos) παρουσιάζουν θεραπευτικά στοιχεία για την πορεία της νόσου. Για παράδειγμα, τα εξωσώματα αυτά φέρουν ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες, που συμπεριλαμβάνουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες σαν την IL-10 και των TGF- β , οι οποίες καταστέλλουν την υπερ-δραστηριοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Με τον επαναπρογραμματισμό των μακροφάγων από τα MSC-EXOs, υιοθετείτε ο M2 φαινότυπος που μειώνει την εκάστοτε φλεγμονή και ενισχύει την αποκατάσταση ιστών. Αναστέλλεται επίσης ο πολλαπλασιασμός των T-λεμφοκυττάρων μετριάζοντας την βλάβη του ΚΝΣ. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα μεταφέρουν βιοδραστικά μόρια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενισχύοντας την νευρωνική αναγέννηση. Εκτός της ανοσοκαταστολής, παράλληλα διευκολύνεται η αποκατάσταση της βλαβερής μυελίνης και τα εξωσώματα βοηθούν στην αποκατάσταση της νευρωνικής λειτουργίας. Ο πολλαπλός ρόλος των MSC-EXOs στην ανοσολογική απόκριση, τους καθιστά βιώσιμους υποψηφίους στην θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών σαν την σκλήρυνση κατά πλάκας [58].



Εικόνα 24: Ένα παράδειγμα του ρόλου των EVs στη φλεγμονή και την απομυελίνωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας (Πηγή Εικόνας: [60]).

Τα εξωσώματα ως ρυθμιστές των φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Τα εξωσώματα έχουν ουσιώδη ρόλο στην ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, και συγκεκριμένα μέσα από την επίδρασή τους με τα μακροφάγα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού. Τα εξωσώματα μπορούν να διαμορφώσουν την κατεύθυνση των μακροφάγων, είτε σε έναν προφλεγμονώδη φαινότυπο M1 είτε σε αντιφλεγμονώδη φαινότυπο M2. Αυτό καθορίζεται από τα σήματα που μεταφέρουν. Ορισμένα mi-RNAs που εμπεριέχονται σε εξωσώματα είναι πιθανόν να επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών μεσολαβητών (mediators) όπως η IL-6 και ο TNF- α , ευνοώντας τον φαινότυπο M1 που είναι σημαντικός για την απομάκρυνση των παθογόνων. Από την άλλη πλευρά, μόρια που εκφράζουν τον M2 φαινότυπο, υποστηρίζουν την αποκατάσταση ιστών και την λήξη μιας φλεγμονής. Με αυτόν τον τρόπο εξισορροπείται η λειτουργία των εξωσωμάτων στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και ιδιαίτερα για την διάρκεια χρόνιων ασθενειών [12].

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

2. Ενιαία Υγεία (One Health)

Με τον όρο “Ενιαία Υγεία” ονομάζεται η προσέγγιση η οποία εκφράζει μια καινοτόμο και ολοκληρωμένη στρατηγική που αντιλαμβάνεται τις λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και του περιβάλλοντος. Προωθώντας την συνεργασία πολλών επιστημονικών κλάδων και της συστημικής σκέψης, η Ενιαία Υγεία έχει ως στόχο την διαρκή και ταυτόχρονα βιώσιμη βελτίωση των υγειονομικών εκβάσεων σε όλους τους τομείς που προαναφέρθηκαν, πρωτίστως αντιμετωπίζοντας πολύπλοκες προκλήσεις όπως η μικροβιακή αντοχή (AMR: AntiMicrobial Resistance), η κλιματική αλλαγή και οι ζωοανθρωπονόσοι. Ιδιαίτερα κρίσιμες είναι οι διενέργειες για τον μετριασμό της AMR κατά την οποία ανθεκτικά παθογόνα μικρόβια μέσω των συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης, των ζωικών πληθυσμών, των οικοσυστημάτων και των τροφικών αλυσίδων, εξαπλώνονται, θέτοντας σοβαρές απειλές στην παγκόσμια ασφάλεια και υγεία. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC: European Centre for Disease Prevention) είναι ο φορέας συντονισμού των οργανισμών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και οργανώνει τις ολοκληρωμένες παρεμβάσεις. Οι προσπάθειες αυτές στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας, δίνουν έναν δρόμο ανθεκτικότητας έναντι στις απειλές, με ανάδειξη κυρίως στον ζωτικό ρόλο στην δημόσια υγεία της σύγχρονης ζωής [61], [62].



Εικόνα 25: Βασικός Πυρήνας της Ενιαίας Υγείας (Πηγή: [63]).

2.1 Συγκεντρωτική δράση για την Ενιαία Υγεία.

Όλες οι προαναφερόμενες απειλές έχουν προβληματίσει τα αρμόδια όργανα, για το λόγο αυτό έχει στηθεί από κοινού από διεθνούς οργανισμούς, τον Νοέμβριο του 2023 ένας οδηγός σχετικά με τις προτεραιότητες που έχουν τεθεί για να εφαρμοστεί η προσέγγιση της ενιαίας υγείας στην επικράτεια της Ευρώπης.

Οι οργανισμοί που συμβάλουν στο κοινό πλαίσιο για την εφαρμογή της Ενιαίας υγείας είναι:

- Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA)
- Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Προϊόντων (ECHA)
- Ευρωπαϊκός Οργανισμός Περιβάλλοντος (EEA)
- Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ECDC)
- Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA)

Οι στόχοι που θεσπίστηκαν τον Νοέμβριο 2023 από τους παραπάνω οργανισμούς στην Ευρωπαϊκή Ένωση, είναι:

- η βελτίωση των επιστημονικών δεδομένων για να στηριχθεί η επιστημονική δράση στο πλαίσιο της Ενιαίας υγείας,
- η ενσωμάτωση της παραμέτρου της Ενιαίας υγείας για την λήψη αποφάσεων στην εκτίμηση κινδύνου και στην παροχή κατευθυντήριων γραμμών και πρωτοκόλλων,
- η καθιέρωση μηχανισμών για την συνεργασία ποικίλων τομέων και ο συντονισμός αυτών και των συστημάτων επιτήρησης για έγκαιρη δράση,
- η ανάπτυξη επιμορφωτικών προγραμμάτων για την Ενιαία Υγεία, τόσο στον πανεπιστημιακό κλάδο όσο και στους επαγγελματίες στον τομέα της υγείας [64].

Ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας), στην διάρκεια της πανδημίας υπογράμμισε την ανάγκη για να μπορέσει να ενδυναμωθεί η Ενιαία Υγεία, δίνοντας έμφαση στο να συνδεθεί ο πληθυσμός με το περιβάλλον, καθώς και προωθηθεί μια υγιέστερη οικολογική ανάκαμψη από τον COVID-19.

Η ανθρώπινη υγεία είναι ο ογκόλιθος για την παγκόσμια υγειονομική ασφάλεια, η οποία διατηρείται μέσω της δυνατότητας στην χρήση καθαρού αέρα, πόσιμου νερού, ασφαλών και βρώσιμων τροφίμων και διατροφής, αλλά και μέσω της δυνατότητας στην διαθεσιμότητα και πρόσβαση σε φάρμακα [65].

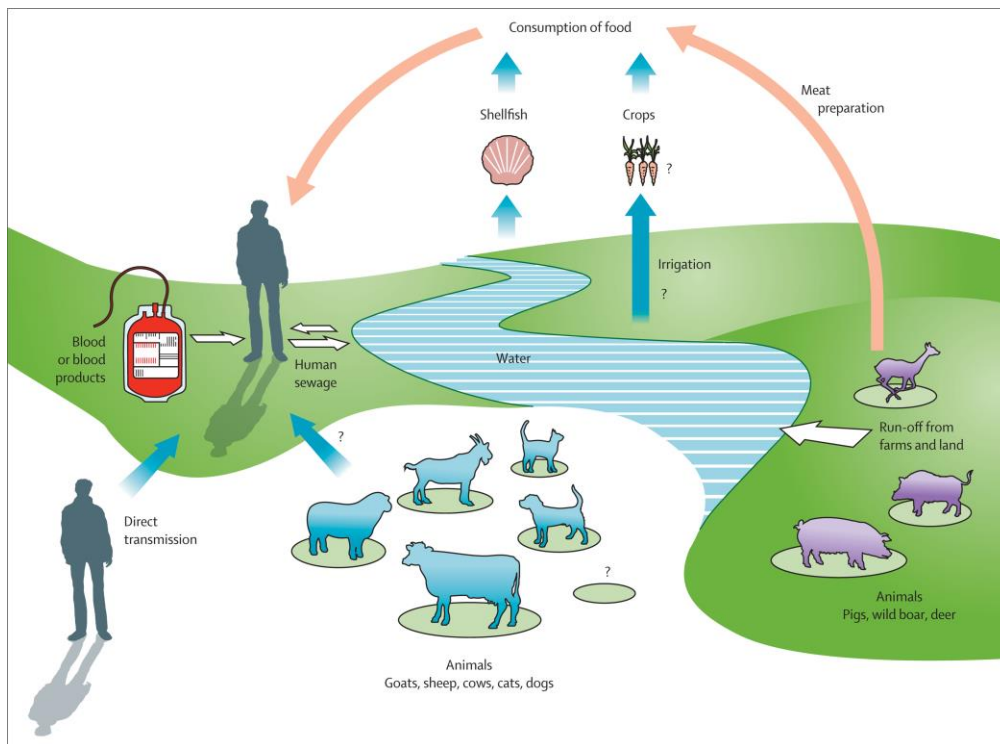
2.2 Σημασία της Ενιαίας Υγείας (One Health) στις ασθένειες (λοιμώδεις)

Η προσέγγιση της Ενιαίας Υγείας είναι απαραίτητη για την διαχείριση της διασυνδεδεμένης φύσης λοιμωδών νοσημάτων και συγκεκριμένα των ζωνοόσων, των ασθενειών δηλαδή που μεταδίδονται από ζώα στον άνθρωπο. Σε αυτό το πλαίσιο αναγνωρίζεται ότι το 75% όλων των EIDs (Emerging Infectious Diseases) έχουν ζωική προέλευση. Οι βασικές ασθένειες που υπογραμμίζουν την ανάγκη για συντονισμένη προσπάθεια από πολλαπλούς επιστημονικούς τομείς είναι το AIDS, το SARS και η γρίπη των πτηνών [66].

Στην εμφάνιση μολυσματικών ασθενειών περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν επίσης να έχουν σημαντικό ρόλο, όπως η υποβάθμιση των οικοσυστημάτων και η απώλεια της βιοποικιλότητας (biodiversity loss). Η εξάπλωση για παράδειγμα του COVID-19 συνδέεται με τις περιβαλλοντικές αλλαγές και πιο συγκεκριμένα με την διεπαφή ανθρώπου – ζώου και περιβάλλοντος [67].

2.2.1 Ενιαία υγεία στα υδάτινα περιβάλλοντα

Τα υδάτινα περιβάλλοντα έχουν θεμελιώδη ρόλο στην ενιαία υγεία, καθώς αποτελούν αγωγό για την μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών και κυρίως ιών μεταξύ ανθρώπων ζώων και οικοσυστημάτων. Ιοί όπως ο νοροϊός, η Ηπατίτιδα Ε και ο ροταϊός ευδοκιμούν σε πηγές νερού, οι οποίες είναι μολυσμένες από ζωικά και ανθρώπινα απόβλητα, καθιστώντας τις υδάτινες οδούς κρίσιμες για την κατανόηση επιδημιών. Στο επιστημονικό άρθρο “A water – focused one health approach for early detection and prevention of viral outbreaks” υποστηρίζεται ότι το βασικό βήμα για την επιδημιολογική παρακολούθηση και πρόληψη, είναι ο εντοπισμός των κυρίων οδών έκθεσης, η στοχευμένη επιτήρησή τους και η χαρτογράφηση που θα ακολουθήσει τις παρεμβάσεις που αποσκοπούν για την αναστολή μετάδοσης ασθενειών [68].



Εικόνα 26: Η επίδραση της Ενιαίας Υγείας στην εξάπλωση της Ηπατίτιδας Ε (Πηγή Εικόνας: [69]).

Ιογενής ασθένειες οι οποίες μεταδίδονται με το νερό είναι μεγάλο πρόβλημα κυρίως σε χώρες με περιορισμένες συνθήκες υγιεινής. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία από τον ΠΟΥ, οι λοιμώξεις προερχόμενοι από ιούς συμβάλλουν σε παραπάνω από 450.000 παιδικούς θανάτους ετησίως και μεγαλύτερη επιβάρυνση υπάρχει σε περιοχές της Αφρικής και της Ασίας με χαμηλό εισόδημα και εξαθλιωμένες συνθήκες ζωής. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει πρόσβαση σε καθαρό νερό επιδεινώνει τα ζητήματα ασθενειών μεταξύ των πληθυσμών. Η επιστημονική κοινότητα τονίζει την ανάγκη για την αξιοποίηση μηχανημάτων επεξεργασίας λυμάτων αλλά και μηχανισμών έγκαιρης προειδοποίησης κινδύνου που ανιχνεύουν συγκεντρώσεις ιών στα ανθρώπινα περιττώματα. Αυτοί οι μηχανισμοί παρακολούθησης είναι προληπτικό μέτρο που επιτρέπει στους υπευθύνους δημόσιας υγείας να δράσουν πριν την εμφάνιση ευρείας μετάδοσης [68].

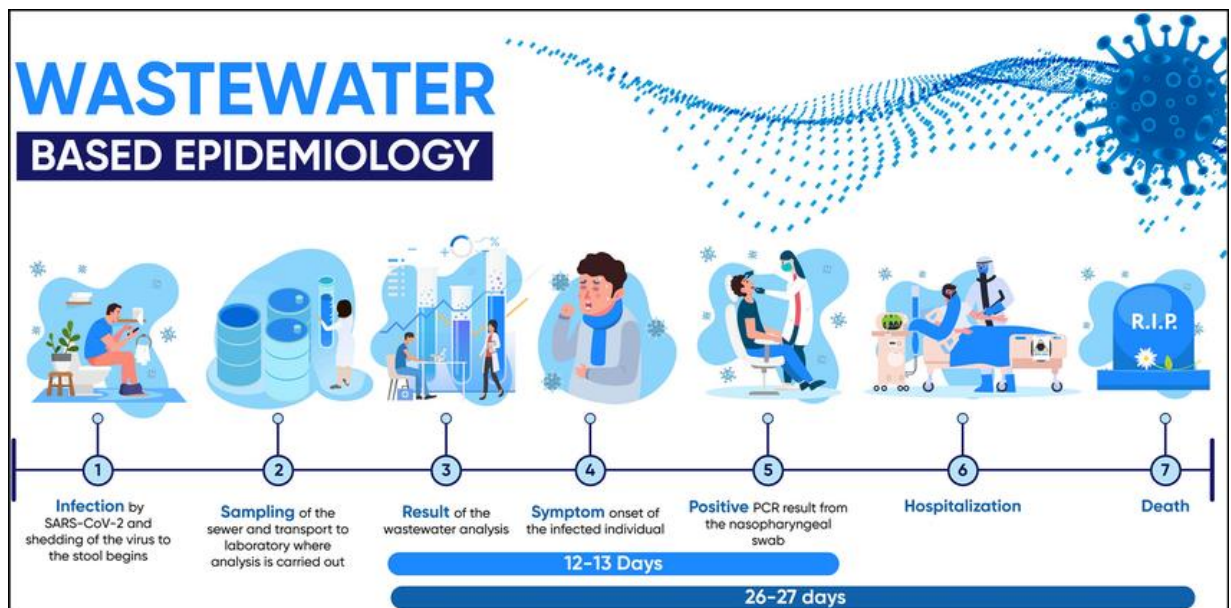
Στο επιστημονικό άρθρο του Naddeo, εξετάζεται η περίπτωση των ζωνοδόσων που αποτελούν το 75% των νεοεμφανιζόμενων λοιμώδων νοσημάτων παγκοσμίως, και μολύνουν τελικά τους ανθρώπους μέσω μολυσμένων πηγών νερού. Ο ιός του δυτικού Νείλου, ο ιός Ζίκα και ο Δάγκειος Πυρετός μεταδίδονται μέσω φορέων που σχετίζονται με υδάτινα περιβάλλοντα, και φορείς που ευδοκιμούν σε αυτά, όπως τα κουνούπια [70].

Στις υδατογενείς ασθένειες, σημαντικός ρόλο παίζει ο αντίκτυπος της κλιματικής αλλαγής αλλά και της αστικοποίησης. Τα αστικά λύματα και οι υπερχειλίσεις των αποχετεύσεων CSO (Combined Sewer

Overflows) εισάγουν στην επιφάνεια των υδάτων ανεπεξέργαστα ή μερικώς επεξεργασμένα λύματα, συνεπώς σε στιγμές έντονων βροχοπτώσεων αυξάνεται ο κίνδυνος έκθεσης σε μικροοργανισμούς όπως αδενοϊοί και εντεροϊοί σε δημόσιες πηγές νερού. Για τον μετριασμό αυτών των κινδύνων είναι απαραίτητη η διαχείριση των βρόχινων υδάτων σε αστικές περιοχές. Με το να μειωθεί η ροή ανεπεξέργαστων λυμάτων σε πυκνο-κατοικημένες περιοχές, είναι στρατηγική που υποστηρίζεται από την ενιαία υγεία, καθώς ο αντίκτυπος της που επηρεάζει την ανθρώπινη και περιβαλλοντική υγεία γίνεται όλο και οξύτερος [68].

Η πρόοδος της τεχνολογίας για επεξεργασίες υγρών αποβλήτων είναι αναγκαία για την μείωση ιικών φορτίων στα συστήματα ύδρευσης. Τέτοια καινοτόμα τεχνολογία αποτελούν οι φωτο-βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούν φύκια και βακτήρια για την αποικοδόμηση των ρύπων στα λύματα. Οι αναφερόμενες και ως “Πράσινες” τεχνολογίες πέρα από τον περιορισμό κινδύνων για την υγεία σε ασθένειες που μεταφέρονται με το νερό, συνάδουν παράλληλα και με τους στόχους βιώσιμης ανάπτυξης ΣΒΑ (sustainable development goals SDGs), ενισχύοντας την οικολογική ανθεκτικότητα. Παράλληλα, στο άρθρο του ο Naddeo, υποστηρίζει την πολιτική του IPPC (Integrated Pollution Prevention and Control), η οποία ενθαρρύνει τα κράτη να υιοθετήσουν αυστηρές πρακτικές για την διαχείριση των αποβλήτων και συνεπώς για τη μείωση της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Ένα παράδειγμα είναι ο περιορισμός της άμεσης απόρριψης αποβλήτων σε ποτάμια, και η κατεύθυνση διαχείρισης για τα στερεά απόβλητα [70].

Ένας ακόμη λόγος για την ανάδειξη των υδάτινων περιβαλλόντων ως κρίσιμα για την διαχείριση μολυσματικών ασθενειών ήταν η πανδημία του COVID-19. Η WBE επιδημιολογία για τα υγρά απόβλητα (Wastewater-based epidemiology) έχει εφαρμοστεί ευρέως σαν μηχανισμός για την διάγνωση του SARS-CoV-2 σε πολλές επιστημονικές ομάδες, επιτρέποντας στους αρμόδιους να ασχοληθούν με αυτό. Με την WBE, υπάρχει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης ιικού φορτίου πριν εμφανιστεί η έξαρση κλινικών κρουσμάτων, βοηθώντας έτσι στην κατανομή πόρων και στις προσπάθειες μετριασμού των κρουσμάτων [68].



Εικόνα 27: Οπτική παρουσίαση της επιδημιολογίας των λυμάτων (Πηγή Εικόνας: [71]).

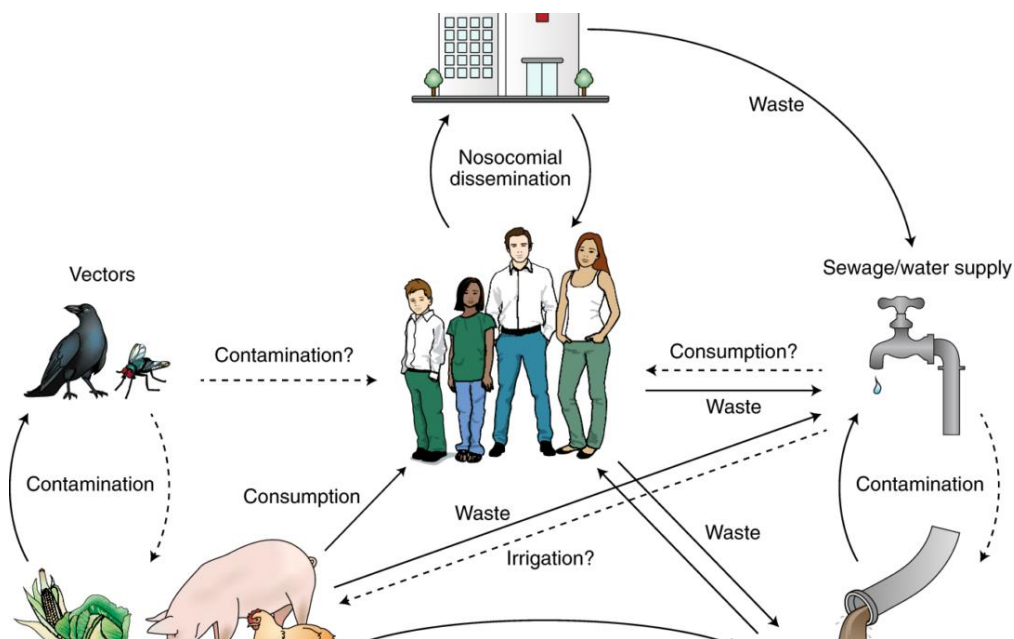
2.2.2 Ενιαία υγεία και αντίσταση σε αντιβιοτικά

Η επιστημονική κοινότητα καλείται να διαχειριστεί την απειλή της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά η οποία προκύπτει από την εκτεταμένη και ταυτόχρονα κακή χρήση τους, σε ανθρώπινους, κτηνιατρικούς και περιβαλλοντικούς τομείς. Αυτό συμβάλλει στην αντοχή του οργανισμού σε απειλές, επηρεάζοντας έτσι την μικροβιακή εξέλιξη, δημιουργώντας αναπόφευκτα, μικρόβια περισσότερο εξελιγμένα, με διαφορετικά χαρακτηριστικά, που όλο γίνονται και λιγότερο ανιχνεύσιμα. Στις προδιαγραφές της Ενιαίας Υγείας, το να μετριάσει η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, είναι πολιτική που μπορεί να αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική, αφού βακτήρια μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας μέσω υδατικών συστημάτων και γεωργικών εκροών. Γενικότερα τα βακτήρια που εκτίθενται σε αντιβιοτικά είτε αυτά προέρχονται από κλινικές ρυθμίσεις, είτε από ύδατα, είτε από μονάδες γεωργίας και κτηνοτροφίας, υποβάλλονται σε προσαρμογές που ευνοούν την απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας. Παραδείγματα γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, είναι αυτά της σύζευξης και μεταφοράς τρानσποζονίων που σε οικολογικές περιοχές διευκολύνουν την ανθεκτικότητα [72], [73], [74].

Οι μηχανισμοί που τα βακτήρια αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ποικίλει ανάλογα τον τομέα στον οποίο βρίσκονται. Στα Gram αρνητικά βακτήρια που σχετίζονται με ζωικές και περιβαλλοντικές πηγές, η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν πραγματοποιείται μέσω εξέλιξης επιπλέον εμποδίων για τα φάρμακα στην εξωτερική τους μεμβράνη και λόγω των αντλιών εκροής, ενώ τα Gram θετικά βακτήρια σε περιβάλλοντα υγειονομικής φροντίδας ανθρώπων, αποκτούν την ανθεκτικότητά τους με την αλλαγή των θέσεων δέσμευσης στόχων (target- binding sites). Η προσέγγιση της Ενιαίας Υγείας υπενθυμίζει ότι οι μηχανισμοί προσαρμογής των βακτηρίων δεν απομονώνονται σε

συγκεκριμένα περιβάλλοντα, αλλά μπορούν να μεταναστεύσουν από τομέα σε τομέα με γονίδια κοινής αντοχής [73], [74].

Η κτηνοτροφία υψηλού ρυθμού (υψηλής πυκνότητας) οδηγεί στην χρήση αντιβιοτικών για την ανάπτυξη και προφύλαξη των ζώων ενθαρρύνοντας έτσι την ανθεκτικότητα για τα βακτήρια στο έντερο των ζώων. Αποτέλεσμα είναι, η κοπριά να είναι πλούσια σε υπολείμματα αντιβιοτικών και με την μεταφορά μέσω νερού και εδάφους να δημιουργεί περιβαλλοντικές δεξαμενές για ανθεκτικά γονίδια, που με την σειρά τους να μεταφέρονται στον άνθρωπο. Οι παρεμβάσεις την Ενιαίας Υγείας για τα αντιβιοτικά σε κτηνοτροφικές και γεωργικές μονάδες, περικλείονται από αυστηρούς κανονισμούς για την βιώσιμη διαχείριση αποβλήτων και για την υποστήριξη της βιοασφάλειας [74], [75].



Εικόνα 28: Προσέγγιση της αντιμικροβιακής αντοχής με βάση την Ενιαία Υγεία (Πηγή Εικόνας: [76]).

2.3 Αντιμικροβιακή αντοχή

2.3.1 Αύξηση απειλής της μικροβιακής αντοχής

Η πλέον μεγάλη παγκόσμια απειλή στον τομέα της υγείας με απειλές τόσο στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα και το περιβάλλον, είναι η μικροβιακή αντοχή (AMR). Στις χώρες-μέλη του OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), το 20% του συνόλου των λοιμώξεων αποτελείται από αυτές που είναι ανθεκτικές σε βακτήρια, γεγονός που συνιστά κίνδυνο στα συστήματα δημόσιας υγείας. Υπάρχει μια αυξανόμενη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και ειδικότερα σε αυτά της τελευταίας λύσης. Παραδειγματικά, σύμφωνα με προβλέψεις αρμόδιων φορέων των OECD, η αντοχή σε φάρμακα αντιμικροβιακής δράσης τρίτης γραμμής θα υπερδιπλασιαστεί έως το 2035. Έτσι αναδεικνύεται

τακτικά η ανάγκη της σφαιρικής στρατηγικής για την ενιαία υγεία, με ξεκάθαρο στόχο τον μετριασμό της AMR [77].

2.3.2 Επιπτώσεις της AMR σε οικονομία και υγεία

Οι ανθεκτικές λοιμώξεις, φέρουν πολλές οικονομικές και υγειονομικές επιβαρύνσεις στο σύστημα υγείας αφού οδηγούν σε παρατεταμένες παραμονές σε νοσοκομειακές μονάδες, υψηλά ποσοστά θνησιμότητας αλλά και μείωση στην παραγωγικότητα του εργατικού προσωπικού. Σε χώρες της Ε.Ε., οι επιπτώσεις των λοιμώξεων αυτών κοστίζουν συνολικά 28,9 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως σε δαπάνες υγείας. Οι επιπλοκές που φέρει η AMR έχει επίσης αντίκτυπο στις ανθρώπινες ζωές αφού περίπου 79.000 χάνονται ετησίως, αριθμός που ξεπερνά το σύνολο των θανάτων από γρίπη, AIDS και φυματίωση μαζί. Φαίνεται πως οι ευάλωτοι πληθυσμοί όπως τα βρέφη και οι ηλικιωμένοι πλήττονται δυσανάλογα και έτσι γίνεται πιο επείγουσα από ποτέ η ανάγκη για την αύξηση κεφαλαίων και επενδύσεων στην επιτήρηση της AMR και στην λοιμωξιολογική πρόληψη [77].

2.3.2.1 Πολιτικές παρεμβάσεις στην AMR

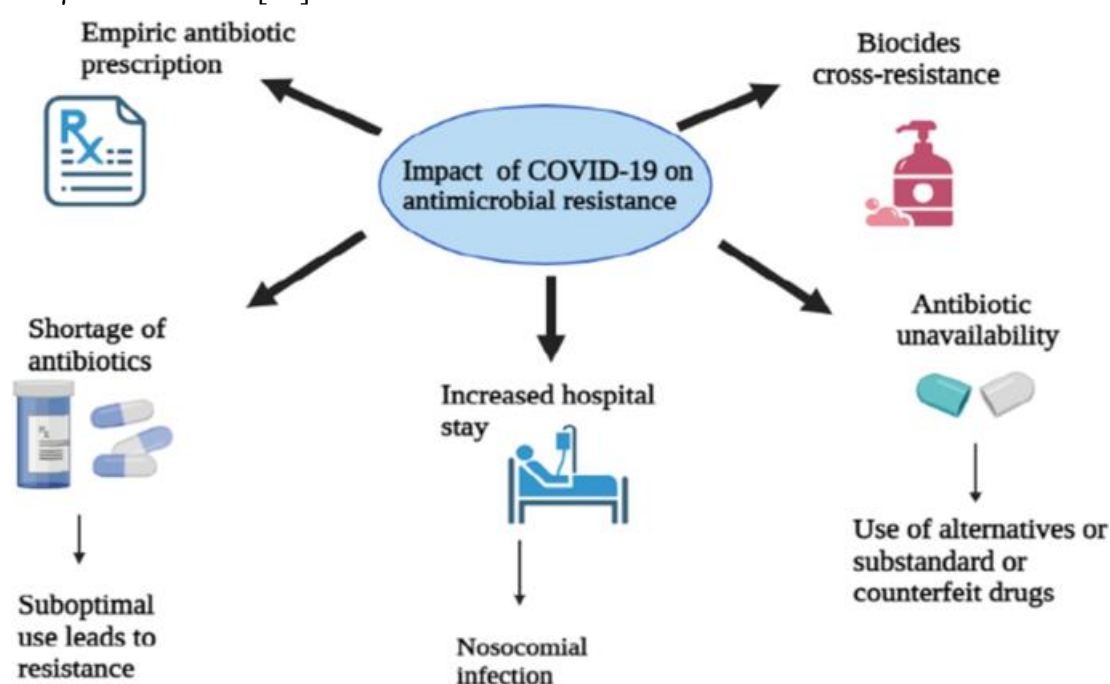
Ήδη οι παρεμβάσεις και οι αποφάσεις που έχουν ληφθεί έχουν δείξει ιδιαίτερο δυναμικό στον περιορισμό της εξάπλωσης της AMR. Προγράμματα αντιμικροβιακής διαχείρισης στην υγεία αλλά και οι βελτιωμένες πρακτικές υγιεινής, έχουν δείξει ότι αποτελούν οικονομικά αποδοτικά μέτρα. Ένα από τα χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά, είναι η υποχρεωτική ηλεκτρονική συνταγογράφηση αντιβίωσης από τον αρμόδιο ιατρό. Στην Ελλάδα αυτό το μέτρο θεσπίστηκε σχετικά πρόσφατα, την 1η Σεπτεμβρίου 2020. Στον τομέα της γεωργίας και των γεωργικών συστημάτων, η ενίσχυση της βιοασφάλειας σε συνδυασμό με τις πρακτικές ασφάλειας τροφίμων έχουν αποδώσει υποσχόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα στις χώρες του OECD και των G20 για κάθε ένα δολάριο που θα δαπανηθεί σε μικτές πολιτικές στον τομέα της υγείας και των τροφίμων, εκτιμάται ότι παράγεται οικονομικό όφελος ύψους 5 δολαρίων, κάνοντας τις παρεμβάσεις για την AMR μια άκρως βιώσιμη επένδυση σε όλες τις χώρες του κόσμου [77].

2.3.3 Περιβαλλοντικός ρόλος

Για τον πολλαπλασιασμό της AMR, ο σημαντικός ρόλος που έχει το περιβάλλον αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο. Μέσω των απορροών γεωργίας, των φαρμακευτικών βιομηχανιών και των υγρών αποβλήτων από υγειονομικές εγκαταστάσεις, αντιβιοτικά και βακτήρια ανθεκτικά σε αυτά, εισέρχονται στο περιβάλλον. Εκθέσεις από το OECD δείχνουν ότι η συγκέντρωση αντιβιοτικών στα συστήματα ύδρευσης σε παγκόσμια κλίμακα, είναι μετρήσιμη και συμβάλλουν στην επιβίωση των ανθεκτικών βακτηρίων. Είναι καθοριστικής σημασίας για την μείωση των περιβαλλοντικών αποδοχών, οι παρεμβάσεις όπως η βελτίωση των τεχνολογιών επεξεργασίας λυμάτων, και η ρύθμιση στην απόρριψη των φαρμακευτικών αποβλήτων [77].

2.3.4 Η επίδραση της COVID-19 στην AMR

Η πανδημία του COVID-19 είχε ως αποτέλεσμα να διακοπούν οι παρεμβάσεις που είχαν ως επίκεντρο την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ενώ ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της πανδημίας τονίστηκε η σημασία πρακτικών για τον έλεγχο λοιμώξεων. Στην ανθρώπινη υγειονομική περίθαλψη, η κατανάλωση αντιβιοτικών μειώθηκε σημαντικά καθώς ελαχιστοποιήθηκαν οι ιατρικές επισκέψεις για θέματα μη COVID-19, αλλά και επειδή αυξήθηκαν τα μέτρα δημόσιας υγείας σχετικά με την υγιεινή και την αποστασιοποίηση. Οι προσωρινές μειώσεις αυτές, είναι σε αντιδιαστολή με τις μακροπρόθεσμες προκλήσεις, όπως είναι για παράδειγμα η χρήση αντιβιώσεων σε νοσοκομειακό περιβάλλον για πιθανές δευτερογενείς λοιμώξεις. Μέσω της πανδημίας αναδείχθηκαν επιπλέον τα κενά σε κάθε μεμονωμένο εθνικό σύστημα επιτήρησης της AMR αφού όλες οι προτεραιότητες στράφηκαν στα θέματα για COVID-19 [77].



Εικόνα 29: Επίδραση της COVID-19 στην αντιμικροβιακή αντοχή του παιδιατρικού πληθυσμού (Πηγή Εικόνας: [78]).

2.3.5 Εθνικά σχέδια δράσεις για την AMR

Ακρογωνιαίοι λίθοι των προσπαθειών για την αντιμετώπιση της παγκόσμιας αυξανόμενης απειλής, αποτελούν τα εκάστοτε εθνικά σχέδια δράσεις NAPs (National Action Plans), τα οποία όμως παραμένουν άνισα μεταξύ των χωρών. Παρά το γεγονός ότι όλες οι χώρες της Ε.Ε και της G20 συμμαχίας έχουν εκδώσει NAPs για την AMR, μόνο το 20% έχει συμπεριλάβει συγκεκριμένους χρηματοδοτικούς πόρους στον εθνικό προϋπολογισμό. Η ελλιπής χρηματοδότηση, παρεμποδίζει αισθητά την πρόοδο στην εφαρμογή των μέτρων. Εμφανέστερα αυτό συμβαίνει στις χώρες χαμηλού εισοδήματος. Τα αποτελεσματικά NAPs που συμβαδίζουν με τα σχέδια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, δίνουν προτεραιότητα στην αντιμικροβιακή διαχείριση, στα μέτρα πρόληψης, και στις

εκστρατείες για την ευαισθητοποίηση των αρμοδίων. Υπογραμμίζεται έτσι ότι η ευθυγράμμιση των προσπαθειών που κλιμακώνονται με τις αρχές της Ενιαίας Υγείας, μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικά οφέλη, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για την δέσμευση πόρων σχετικά με την AMR [77].

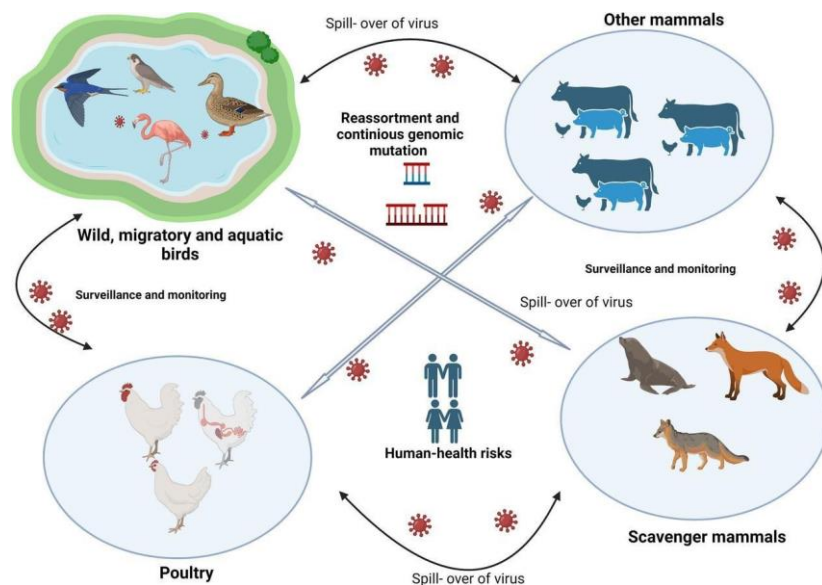
2.4 Λοιμώδεις ασθένειες

2.4.1 Ζωονόσοι

Το υπουργείο εσωτερικών των Η.Π.Α (DOI - Department of Interior) αποτελεί ένα από τα παραδείγματα ουσιαστικής υιοθέτησης της Ενιαίας Υγείας στην ζωή της χώρας μέσα από την διεπιστημονική ομάδα τους. Συγκεκριμένα, σε αυτή έχουν ενταχθεί εμπειρογνώμονες από διαφορετικούς τομείς όπως η δημόσια υγεία, η υγεία των ζώων, τα οικονομικά και το περιβάλλον, και μαζί αναπτύσσουν στρατηγικές που αφορούν την υγεία του ενιαίου οικοσυστήματος. Έπειτα από μια αξιολόγηση που έλαβε μέρος το 2016, το DOI μαζί με το CDC και το USDA (United States Department of Agriculture) συνεργάστηκε για την δημιουργία του πρώτου εργαστηρίου ιεράρχησης ζωοανθρωπονόσων της Ενιαίας Υγείας μέσα στις οποίες συμπεριλήφθηκαν η νόσος Lyme, ο ιός του Δυτικού Νείλου και οι αναδυόμενοι ιοί COVID. Μέσα από αυτό το εργαστήριο γίνεται αντιληπτό πως η στοχευμένη συνεργασία κλάδων, με την δημιουργία αυστηρών δραστικών πλαισίων, μπορεί να αντιμετωπίσει παγκόσμιες απειλές ζωονοσικής σημασίας [79].

2.4.1.1 Γρίπη Πτηνών

Έρευνες που έγιναν στο USGS (United States Geological Survey) ανέδειξαν την κρίσιμη διασταύρωση της υγείας του ανθρώπου με την πανίδα, σχετίζοντας την παθογονικότητα της γρίπης των πτηνών. Η εν λόγω γρίπη, είναι γνωστή για τις καταστροφικές οικολογικές και οικονομικές επιπτώσεις που έχει, όπως επίσης και για το ενδεχόμενο απειλής της ανθρώπινης υγείας μέσω σοβαρών σπάνιων λοιμώξεων όπως αυτών που προκαλούνται από τον ιό H5N1. Με την ανάπτυξη μοντέλων κινδύνου και εργαλείων οπτικοποίησης της μετάδοσης της γρίπης των πτηνών, αντανακλάται το δυναμικό της νόσου σε οικόσιτους αλλά και άγριους πληθυσμούς πτηνών. Στην χερσόνησο Delmarva, έχουν ξεκινήσει προσπάθειες επιτήρησης του βιότοπου, και έτσι παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές δεξαμενές και πως επηρεάζουν την μετάδοση και την επιμονή του ιού [79].



Εικόνα 30: Γραφική απεικόνιση της εξάπλωσης της γρίπης των πτηνών (Πηγή Εικόνας: [80]).

2.4.1.2 Ο ρόλος της κλιματικής αλλαγής

Μέσα στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας, ένας από τους κύριους σκοπούς αυτής της στρατηγικής, αναδεικνύεται και η αντιμετώπιση επιπτώσεων που φέρει η κλιματική αλλαγή τόσο στις μολυσματικές ασθένειες όσο και στην υγεία των οικοσυστημάτων. Το στρες των ζώων αυξάνεται μέσα από την μεταβολή της θερμοκρασίας και των βροχοπτώσεων, οι οποίες αποδυναμώνουν επίσης και το ανοσοποιητικό σύστημα τους, κάνοντάς τα ευάλωτα στην έκθεσής τους σε μικροοργανισμούς. Από το κεντρικό συμβούλιο ρύπων του USGS έγιναν μελέτες οι οποίες έδειξαν το ποσοστό βιοσυσσώρευσης υπερφθοριωμένων αλκυλιωμένων ουσιών PFAS (Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances), συμπεραίνοντας το εύρος σύνδεσης της περιβαλλοντικής ρύπανσης στη υγεία του ανθρώπου. Η Ενιαία Υγεία παρέχει ένα περιεκτικό εργαλείο σχεδιασμού στοχευμένων παρεμβάσεων, και ανάθεσης ευθυνών σε αρμόδιους επιστημονικούς φορείς, εξασφαλίζοντας την ανθεκτικότητα των φυσικών οικοσυστημάτων [79].

2.4.1.3 Νόσος Lyme

Η νόσος Lyme είναι μία ζωνοσογόνος λοίμωξη που μεταδίδεται από το είδος black-legged tick (*Ixodes Scapularis*). Στις Η.Π.Α και συγκεκριμένα στις Βορειοανατολικές περιοχές της χώρας, υπάρχει αυξανόμενη παρουσία περιστατικών από την νόσο του Lyme που κάνει τις πρωτοβουλίες για την Ενιαία Υγεία αναγκαίες ώστε να κατανοηθεί η εξάπλωση της νόσου. Μέσα από έρευνα που διεξήχθη από το USGS εντοπίστηκαν παράγοντες που επηρεάζουν την συχνότητα μετάδοσης των παθογόνων μικροβίων από αυτό το είδος τσιμπουριών, όπου ένας από αυτούς είναι η επικράτηση των ειδών ξενιστών που μεταφέρουν τα βακτήρια όπως είναι οι γρύλοι και τα τρωκτικά λόγω της αλλαγής στο κλίμα. Διερευνώντας τις σχέσεις μεταξύ της κλιματικής αλλαγής, της οικολογίας των ξενιστών και των

πληθυσμών των τσιμπουριών, οι στρατηγικές της Ενιαίας Υγείας πρέπει να παρέχουν αποτελεσματικές μεθόδους διαχείρισης για την συγκεκριμένη νόσο, στοχεύοντας πέρα από την ανθρώπινη υγεία και στην διατήρηση της άγριας πανίδας [79].

2.4.1.4 Πανούκλα και επίπτωση στην οικολογία

Μία από τις προσεγγίσεις της Ενιαίας Υγείας είναι η διαχείριση της πανώλης, μιας βακτηριακής ζωνοόσου η οποία μεταδίδεται μέσω ψύλλων τρωκτικών σε ανθρώπους και άλλα ζώα. Στην αμερικάνικη δύση, η πανούκλα (πανώλη) εξακολουθεί να αποτελεί απειλή στον ζωικό πληθυσμό και συγκεκριμένα στο είδος black-footed ferret (κουνάβι) που απειλούνται υπό εξαφάνιση και μολύνονται από το τρωκτικό σκύλος των λειμώνων (prairie dogs). Η έρευνα του USGS για την πανώλη, τους πληθυσμούς των ψύλλων και την μετάδοση της νόσου, έδειξε την σημασία κατανόησης των επιπτώσεων την νόσου για την πανίδα και την υγεία του ανθρώπου. Με την ανάπτυξη ενός εμβολίου στοματικού για τα prairie dogs, έχει καινοτομηθεί μία λύση από το USGS για να μειωθεί η συχνότητα εμφάνισης της πανούκλας στους άγριους ζωικούς πληθυσμούς, ωφελώντας άμεσα το απειλούμενο υπό εξαφάνιση black-footed ferret. Μέσα από αυτόν τον τρόπο προστατεύεται και η δημόσια υγεία, ελαχιστοποιώντας τις πιθανότητες έκθεσης του ανθρώπου στην ασθένεια [79].

2.5 Υδατοκαλλιέργειες

2.5.1 Εισαγωγή για την ενσωμάτωση της Ενιαίας Υγείας στις ιχθυοκαλλιέργειες

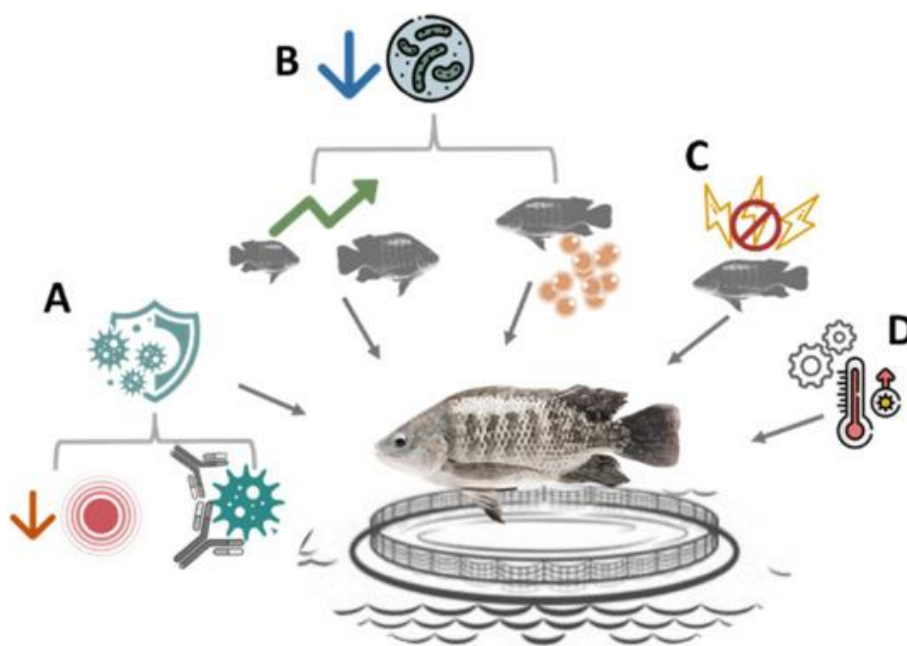
Μέσα στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας που εξετάζεται η υγεία ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος, είναι αναγκαίο να αντιμετωπιστούν οι προκλήσεις που συναντώνται στα συστήματα υδατοκαλλιέργειών. Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας, συνεισφέρει το 50% συνολικά των υδρόβιων ζωικών πρωτεϊνών, που αποτελεί ζωτικής σημασίας πλούτο για την παγκόσμια ασφάλεια επισιτισμού, αφού ταυτόχρονα υπάρχουν και οι περιορισμοί στην φυσική αλιεία. Η εντατικοποίηση του κλάδου αυτού εισάγει στην εξίσωση και σημαντικές ανησυχίες όπως η AMR. Η εκτεταμένη αυτή χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες, είχε φτάσει τους 10.259 τόνους το 2017 και μάλιστα η πρόβλεψη για το 2030 είναι να έχει αυξηθεί, φτάνοντας έως και τους 13.600 τόνους. Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές σε περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και του Ειρηνικού αφού μόνο η Κίνα αντιπροσωπεύει το 58% της παγκόσμιας χρήσης αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες (στοιχεία του 2017) [81], [82].

2.5.2 Διαχείριση μη ενδημικών ειδών στην Ενιαία Υγεία

Κρίσιμη συνιστώσα στην εφαρμογή της Ενιαίας Υγείας είναι η προστασία των μη ιθαγενών ειδών. Τα είδη αυτά σε μεγάλη συχνότητα διαταράσσουν τα εκάστοτε οικοσυστήματα, αλλάζοντας την τροφική αλυσίδα, την ποιότητα του νερού και την βιοποικιλότητα, όμως με την σωστή διαχείριση μπορούν να προσφέρουν οφέλη στον τόπο, όπως για παράδειγμα να αποτελέσουν συμπληρωματικούς παράγοντες στην παραγωγή πρωτεϊνών σε περιοχές που υπάρχει κίνδυνος επισιτισμού αφού τα εισοδήματα είναι σε μεσαία και χαμηλή κατάσταση. Μέσα από αυτήν την διττότητα στο συγκεκριμένο θέμα τονίζεται επιπλέον η έννοια των στρατηγικών διαχείρισης χωρίς αποκλεισμούς που συμμετέχει πληθώρα επιστημονικών κλάδων. Η προσέγγιση της Ενιαίας Υγείας όχι μόνο κατευνάζει τους κινδύνους που σχετίζονται με τα χωροκατακτητικά είδη, αλλά μεγιστοποιεί και την συμβολή τους στην βιωσιμότητα της υδατοκαλλιέργειας υπογραμμίζοντας την ανάγκη για μακροχρόνια οικολογική έρευνα [83].

Με την εισαγωγή των μη ιθαγενών ειδών στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας, η δυναμική των παθογόνων επηρεάζει τόσο αυτούς τους πληθυσμούς όσο και τους γηγενείς. Τα NNS (Non Native Species) είναι συχνό φαινόμενο να μεταφέρουν παθογόνα μικρόβια έναντι των οποίων τα ντόπια δεν διαθέτουν ανοσία, οδηγώντας έτσι σε συνέπειες αρκετά σοβαρές όπως η μειωμένη ανάπτυξη, η χρόνια θνησιμότητα και η μακροπρόθεσμη εξαφάνιση. Το στρείδι του Ειρηνικού (*Crassostrea gigas*) έκανε εισαγωγή του δικού του παράσιτου, που φέρει την ονομασία *Myicola ostreae*, στα εγχώρια ευρωπαϊκά στρείδια, μειώνοντας την ανάπτυξή τους και δημιουργώντας οικονομικές ζημιές. Σε μια παρόμοια κατάσταση, το παράσιτο με την ονομασία *Gyrodactylus salaris* μεταφέρθηκε στον πληθυσμό της Νορβηγίας μέσω του σολομού της Βαλτικής, και τον κατέστρεψε. Με μία διαφορετική όψη όμως, μεμονωμένα περιστατικά από NNS έχουν την ικανότητα να αραιώνουν τα μολυσματικά φορτία μέσα σε έναν πληθυσμό. Για παράδειγμα, με το στρείδι του Ειρηνικού που λειτούργησε ως δόλωμα για τις μολύνσεις από τρηματοειδή, μειώθηκαν τα φορτία παρασίτων στους ντόπιους πληθυσμούς μυδιών [83].

Τα NNS για την παγκόσμια επισιτιστική ασφάλεια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο, αφού είναι κεντρικής σημασίας ειδικότερα στις περιοχές με περιορισμένες πηγές πρωτεΐνης. Τα σολομοειδή, ο κυπρίνος και η τιλάπια είναι τα κυρίαρχα είδη παγκοσμίως και συναντώνται συχνά εκτός φυσικών περιοχών. Η ανάπτυξη συστημάτων πολυκαλλιέργειας ιθαγενών και μη ιθαγενών πληθυσμών έχουν αποδειχθεί πετυχημένα στην αύξηση βιομάζας και διασφάλισης ποιότητας των πόρων όπως έχει παρατηρηθεί σε Νοτιοανατολική Ασία και Ινδία. Συμπεριλαμβάνοντας τις εκτιμήσεις της οικολογικής θέσης και των πρωτοκόλλων βιοασφάλειας, είναι απαραίτητη η εξισορρόπηση των πλεονεκτημάτων των NNS σε έναν υδάτινο πληθυσμό, με την δυνατότητα τους να αλλοιώσουν το οικοσύστημα [83].



Εικόνα 31: Προσέγγιση της Ενιαίας Υγείας για τα μη αυτόχθονα ψάρια (Πηγή Εικόνας: [84]).

2.5.3 Αυξανόμενος πληθυσμός και υδατοκαλλιέργεια

Μέχρι το 2050, ο πληθυσμός των ανθρώπων στην γη εκτιμάται να αγγίζει τα 10 δισεκατομμύρια, και έτσι η ανάγκη βιώσιμων υδατοκαλλιεργειών είναι πιο επίκαιρη από ποτέ για να καλύψει τις αυξανόμενες ανάγκες σε πρωτεΐνες, χωρίς όμως περιβαλλοντική επίπτωση. Με την πληθυσμιακή αύξηση, οι υδατοκαλλιέργειες θα μετατοπιστούν στον κυρίαρχο πάροχο πηγών σιτισμού, αφού η στατική αλιεία δεν προβλέπεται να αυξήσει τα επίπεδα παραγωγής. Μέσα από την Ενιαία Υγεία στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας, είναι αναγκαίο να υποστηριχθεί η ανθρώπινη διατροφή και η περιβαλλοντική υγεία. Παραδειγματικά, επεκτείνοντας τις καλλιέργειες φυκιών θα ενισχυθεί η παραγωγή τροφίμων προσελκύοντας νέο υδατικό πληθυσμό, και επίσης θα παραχθούν υπηρεσίες οικοσυστήματος όπως η διήθηση νερού και η δέσμευση άνθρακα [82].

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

3.Σκοπός

3.1 Ποιος είναι ο σκοπός εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας

Μέσα από την παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός είναι να διερευνηθεί ο ρόλος των εξωσωμάτων ως κρίσιμοι ρυθμιστές βιολογικών εργασιών που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων μικροοργανισμών ξενιστή. Τα εξωσώματα είναι καθοριστικός παράγοντας στην διακυτταρική επικοινωνία και την μεταφορά μορίων. Μέσα από την βιβλιογραφική επισκόπηση επιχειρείται:

- Να γίνει ανάλυση της δομής, των λειτουργιών και της βιογένεσης στα εξωσώματα των ψαριών.
- Να εξεταστούν οι μηχανισμοί από τους οποίους τα εξωσώματα επηρεάζονται για την διακυτταρική επικοινωνία μέσα στο πλαίσιο της ανοσολογικής απόκρισης.
- Να γίνει προβολή ερευνητικών ευρημάτων τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στην διαχείριση ασθενειών που αφορούν ιχθυοκαλλιέργειες και γενικότερα το θαλάσσιο περιβάλλον.
- Να φωτιστούν διαδικασίες σχετικά με την ρύθμιση φλεγμονωδών αποκρίσεων στα ψάρια, και σχετικά με την μεταφορά μορίων που επηρεάζουν την βιωσιμότητα και την μολυσματικότητα των παθογόνων.
- Να παρατεθούν τρόποι όπου συγκεκριμένα εξωσώματα προερχόμενα από τον άνθρωπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν εντός του οικισμού της ιχθυοκαλλιέργειας.

Μέσω της εργασίας επιδιώκεται να γίνει κατανόηση της βιολογικής σημασίας των εξωσωμάτων για την αξιοποίηση τους σε υδατοκαλλιεργικά περιβάλλοντα. Μέσα από αυτήν την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων, σκοπός είναι να βελτιωθεί ο τρόπος διαχείρισης ασθενειών που πλήττουν τις ιχθυοκαλλιέργειες και τον γενικότερο αλιευτικό κλάδο.

4. Μεθοδολογία

4.1 Αναζήτηση Βιβλιογραφίας

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας η αναζήτηση της βιβλιογραφίας έγινε μέσω της ηλεκτρονικής μορφής της εθνικής βιβλιοθήκης της ιατρικής (Pubmed) αλλά και μέσω εκδόσεων και οδηγιών που έχουν αναρτηθεί στις επίσημες ιστοσελίδες των φορέων του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO) και του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC). Αρχικά, έγινε η μελέτη των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs) σχετικά με την μορφολογία και τον τρόπο λειτουργίας τους, και στην συνέχεια ερευνήθηκαν σε βάθος τα εξωσώματα (το μικρότερο είδος EVs) και πως επιδρούν στην ζωή των ανθρώπων. Η μελέτη έγινε σχετικά με τον φυσιολογικό και τον παθολογικό ρόλο τους, στο πως επιδρούν στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στο σύνολο της ανοσολογικής απόκρισης του ανθρώπου. Στην συνέχεια αναπτύχθηκε η έννοια της Ενιαίας Υγείας, τα βασικά δόγματα που υπηρετεί, και πως επηρεάζεται άμεσα η υγεία του ανθρώπου, μέσα από την καθολική υγεία και του ζωικού και του περιβαλλοντικού οικοσυστήματος. Επίσης αναφέρθηκαν οι τρόποι αντιμετώπισης ασθενειών που ευδοκιμούν στο οικοσύστημα, όπου με την επίλυσή τους μέσω παρεμβάσεων της Ενιαίας Υγείας, θα ευνοηθεί και η υγεία στον άνθρωπο. Η μελέτη της Ενιαίας Υγείας επεκτάθηκε και πιο συγκεκριμένα στα υδάτινα περιβάλλοντα και την θεραπεία ασθενειών των ψαριών που ζουν σε υδατοκαλλιέργειες. Στην συνέχεια, μελετήθηκαν εξωσώματα και τα EVs που προέρχονται από ψάρια και πως λειτουργούν ως μέσα για την θεραπεία ασθενειών που πλήττουν το θαλάσσιο οικοσύστημα και τις ιχθυοκαλλιέργειες. Έγινε συγκεκριμένη αναφορά στον ιό NNV που συναντάται σε μεγάλο βαθμό στον πληθυσμό των ψαριών, και η αναζήτηση ολοκληρώθηκε σε εξωσώματα που προέρχονται από οργανισμούς εκτός του θαλάσσιου οικοσυστήματος αλλά που μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα στην επίλυση ασθενειών των ψαριών.

5. Εξωσώματα και EVs σε Ψάρια

5.1 Εισαγωγή

Το σύνολο των υδρόβιων ζώων, από τα τελεόστεα μέχρι και τα μαλάκια, τα ερπετά και τα καρκινοειδή, είναι μια ομάδα ποικιλόμορφων οργανισμών που έχουν σημαντικό οικολογικό και οικονομικό συμφέρον. Κρίσιμοι παράγοντες για τις φυσιολογικές και τις κυτταρικές διαδικασίες επικοινωνίας τους, είναι τα εξωκυτταρικά κυστίδια EVs, συμπεριλαμβανομένων και των εξωσωμάτων. Στα υδρόβια ζώα, EVs έχουν βρεθεί σε υγρά του σώματος όπως η βλέννα, ο ορός και η αιμόλεμφο, όπως επίσης και από καλλιεργημένα κύτταρα πράγμα που τα χαρακτηρίζουν ως ευέλικτους φορείς βιολογικών πληροφοριών. Τα συγκεκριμένα κυστίδια μοιράζονται λειτουργικούς παραλληλισμούς με εκείνους των χερσαίων ζώων, και παρέχουν πληροφορίες για μηχανισμούς σχετιζόμενους με την ανοσία, την προσαρμογή και την διακυτταρική επικοινωνία [84].

Η ποικιλομορφία που διέπει τα EVs στα ψάρια αναφέρεται στο περιεχόμενο, τους ρόλους και τις πηγές απομόνωσής τους. Παραδειγματικά, συγκεκριμένα EVs έχουν απομονωθεί από πλάσμα καρχαρίων νοσοκόμων (Nurse Sharks), από την βλέννα του Βακαλάου Ατλαντικού / Γάδου (Atlantic Cod) και τον ιστό του μανδύα από μαλάκια. Το μοριακό τους περιεχόμενο (Πρωτεΐνες, λιπίδια και ρυθμιστικά μόρια miRNAs) εμφανίζουν λειτουργική σημασία στις ανοσολογικές αποκρίσεις, στις προσαρμογές για το στρες αλλά και στις αναπαραγωγικές διαδικασίες. Ενδεικτικά, ρυθμιστικά μόρια miRNAs που βρέθηκαν σε EVs από Κινεζική γλώσσα (Chinese tongue sole) συνδέονται με τον προσδιορισμό φύλου, ενώ miRNAs που απομονώθηκαν από EVs στην αιμόλεμφο της κόκκινης караβίδας, φάνηκαν να παίζουν ρόλο στην ανοσολογική άμυνα του οργανισμού σε περίπτωση μία ιογενούς λοίμωξης. Με τα ευρήματα αυτά, καταδεικνύεται πως το μικροπεριβάλλον των υδρόβιων οργανισμών είναι αυτό που διαμορφώνει την σύνθεση και τις λειτουργίες των EVs [84].

Τα τελευταία χρόνια, η χαρτογράφηση και η εφαρμογή των EVs στα υδρόβια ζώα, έχουν ανοίξει οδούς για καινοτόμες έρευνες. Προηγμένες μέθοδοι όπως η υπερφυγοκέντρωση, η απομόνωση με διαβάθμιση πυκνότητας και η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων, διευκολύνουν την μελέτη των EVs. Οι προσεγγίσεις αυτές, έχουν αποκαλύψει βιοδείκτες ως πιθανούς υποψηφίους για την παρακολούθηση της υγείας των οργανισμών αυτών, όπως για παράδειγμα συγκεκριμένα ρυθμιστικά μόρια miRNAs που ανταποκρίνονται στο στρες και πρωτεΐνες που συνδέονται με τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Εκτός της βασικής έρευνας, τα EVs μπορούν να θεωρηθούν και φορείς για την μεταφορά και χορήγηση φαρμάκων σε υδατοκαλλιέργειες για την διάγνωση ασθενειών, προσφέροντας λύσεις φιλικές και ειδικές στο εκάστοτε περιβάλλον, βελτιώνοντας την παραγωγικότητα και την βιωσιμότητά τους. Με

την γεφύρωση των πρακτικών ιχθυοκαλλιέργειας και της μοριακής βιολογίας, η μελέτη στα EVs ανοίγει δρόμους για την διαχείριση των υδρόβιων ζώων σε μεταβαλλόμενες συνθήκες περιβάλλοντος [84].

5.2 Εξωσώματα σε διαφορετικά είδη ψαριών

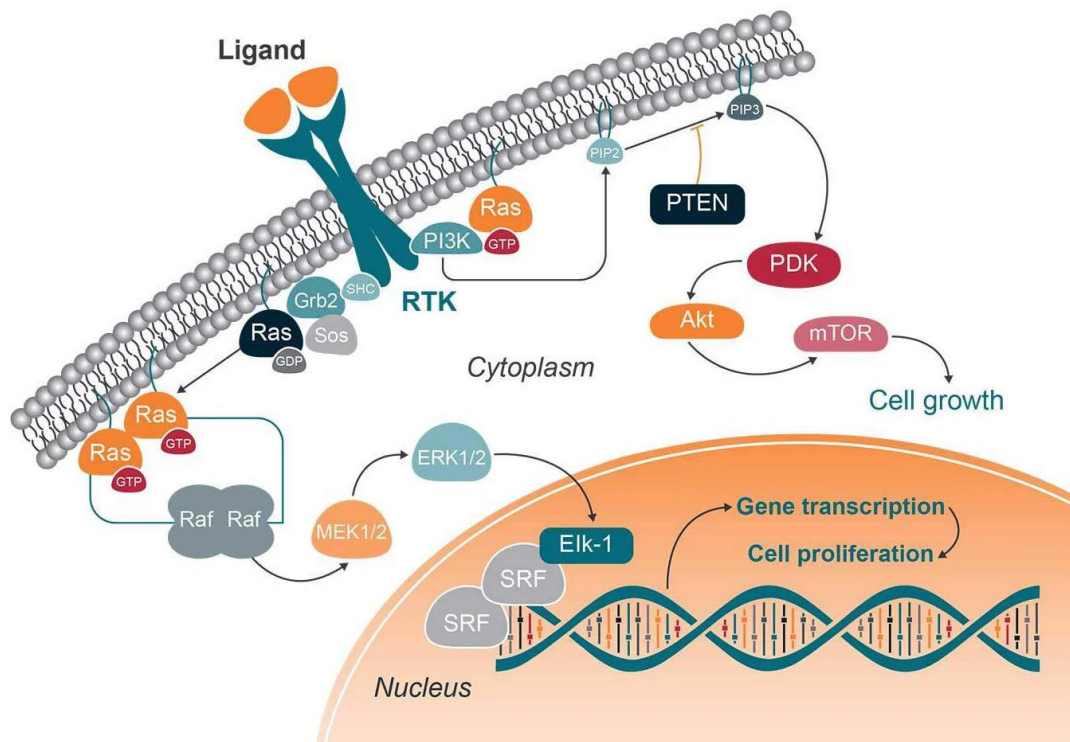
5.2.1 Zebrafish (αγγώδες ψάρι- ζέβρα)

Στο είδος του Zebrafish, τα EVs που απελευθερώνονται στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου προερχόμενου από μελάνωμα, φέρουν μεγάλη ποικιλομορφία τόσο σε μέγεθος όσο και σε μοριακό περιεχόμενο ανάλογα με την προέλευση και τις εξωκυττάρειες συνθήκες. Στην περίπτωση αυτή, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί ενδοκυτταρικά EVs (iEVs: Interstitial EVs) με την χρήση προηγμένων απεικονιστικών τεχνικών κυρίως βιοχημικών, όπως για παράδειγμα με ανοσοαποτύπωση Western blotting και ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων για δείκτες εξωσωμάτων όπως το Alix και η CD63. Τα συγκεκριμένα iEVs παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα κύτταρα μελανώματος. Η συγκεκριμένη αφθονία, τα καθιστούν πολύτιμα για την κατανόηση της εξέλιξης του μελανώματος και για την χρήση τους ως βιοδείκτες στην καρκινική διάγνωση [85].

Μία από τις κρίσιμες λειτουργίες των εξωσωμάτων που προέρχονται από το μελάνωμα στο Zebrafish, είναι η ικανότητα να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση. Αυτά τα EVs είναι εμπλουτισμένα με μη κωδικοποιημένα RNAs (ncRNAs) συμπεριλαμβανομένων των MRP και των RNAs P που βασικά είναι αυτά που ενεργοποιούν το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Όταν τα iEVs του μελανώματος εγχέονται σε προνύμφες του ψαριού, ξεκινάει η στρατολόγηση και η ενεργοποίηση των μακροφάγων, και παράλληλα αυξάνεται η έκφραση προφλεγμονώδων κυτταροκινών σαν την Il-8. Μέσα από την φλεγμονώδη απόκριση γίνεται αντιληπτό ότι μπορούν να δράσουν σαν μεσολαβητές άγονης φλεγμονής ασκώντας επιρροή στο τοπικό μικροπεριβάλλον του όγκου, και τις συστηματικές ανοσολογικές αποκρίσεις [85].

Στα μοντέλα των Zebrafish, οι επιστήμονες έχουν χρησιμοποιήσει τη γενετική μηχανική έτσι ώστε τα εξωσώματα του μελανώματος να μεταφέρουν ογκογονίδια RAS που έχουν άμεση εμπλοκή με την καρκινογένεση, τα οποία είναι συνδεδεμένα με GFP έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα παρακολούθησης της μετανάστευσης και της δράσης των γονιδίων αυτών. Για την μελέτη της βιολογίας των EVs, το μοντέλο αυτό έχει αποδειχθεί ανεκτίμητο λόγω της ομοιότητας του με την παθολογία του ανθρώπινου καρκίνου. Με αυτό το σύστημα, επιτρέπεται η *in vivo* παρακολούθηση των εξωσωμάτων σε περιπτώσεις καρκίνων που εμπλέκονται τα συγκεκριμένα ογκογονίδια [85].

RAS Signaling Pathways



Εικόνα 32: Αναπαράσταση των θεραπευτικών οδών σηματοδότησης του ογκογονιδίου RAS (Πηγή Εικόνας: [86]).

5.2.2 Πράσινο Καλκάνι (Olive Flounder)

Μία πρωτοποριακή προσέγγιση για την διαχείριση της στρεπτοκοκκίας είναι η χρήση εξωσωμάτων τα οποία προέρχονται από ψάρια μολυσμένα με *Streptococcus parauberis* και απομονώνονται από το πλάσμα τους. Τα εξωσώματα αυτά, φέρουν ειδικά μόρια για το παθογόνο και ενισχύουν την ανοσία τόσο σε προνύμφες όσο και σε ενήλικα πειραματικά ψάρια Zebrafish, ρυθμίζοντας γονίδια σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα σαν τις κυτταροκίνες IL-1β και TNFα που προωθούν την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης, εντοπίστηκαν διάφορες πρωτεΐνες εκφραζόμενες στα εξωσώματα που συνδέονται με βασικά μονοπάτια όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τις ανοσολογικές αποκρίσεις οξείας φάσης. Επίσης, παρατηρήθηκαν πρωτεΐνες ενεργοποίησης T-λεμφοκυττάρων που είναι ζωτικής σημασίας για μακροχρόνια ανοσία αλλά και όσον αφορά μονοπάτια συνδεδεμένα με τον φωσφολιπιδικό μεταβολισμό [87].

5.2.3 Rock Bream (τσιπούρα)

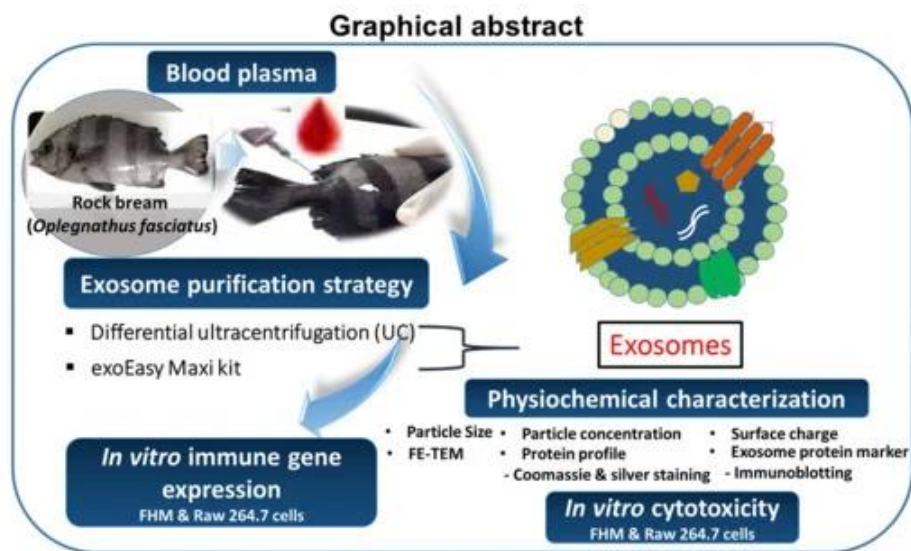
Από το πλάσμα της τσιπούρας (*Oplegnathus fasciatus*), προέρχονται εξωσώματα που βοηθάνε στην κατανόηση των μηχανισμών διακυτταρικής επικοινωνίας στους θαλάσσιους οργανισμούς. Η απομόνωση των εξωσωμάτων αυτών γίνεται με την χρήση διαφορικής υπερφυγοκέντρισης (UC) ή μιας

τεχνικής με χρήση στήλης που έχει μεμβρανική συγγένεια με τα εξωσώματα. Σε σύγκριση με την UC, η δεύτερη τεχνική παρέχει δεκαπλάσια συγκέντρωση και καθαρότητα σωματιδίων αποδίδοντας $1,05 \times 10^{11}$ σωματίδια/ml και παραπάνω άθικτα κυστίδια με την χαρακτηριστική μορφολογία σχήματος κυπέλλου. Τα ευρήματα αυτά καθιέρωσαν το συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την απομόνωση εξωσωμάτων πλάσματος ψαριού σε επόμενες προηγμένες έρευνες. Τα απομονωμένα εξωσώματα βρέθηκαν εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες όπως οι CD63, HSP90 και CD81, προσφέροντας το μέσο για την μελέτη σημάτων μοριακού χαρακτήρα, και υπευθύνων για την ενεργοποίηση ανοσολογικών αποκρίσεων. Η δομική ακεραιότητα που προέρχεται από την βελτιστοποιημένη απομόνωση ενισχύει τις πιθανότητές τους για χρήση ως βιομιμητικούς φορείς σε βιοδραστικά μόρια όπως πεπτίδια ή θεραπευτικά RNA [88].

Εντός των εξωσωμάτων της τσιπούρας μεταφέρονται ενεργά ανοσολογικά μόρια που βοηθάνε στις έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι ιογενών παθογόνων όπως για παράδειγμα του ιριδο-ιού της τσιπούρας (RBIV: Rock Bream Iridovirus). Το φορτίο πρωτεϊνών και RNA στα κυστίδια, περιέχει μόρια συσχετιζόμενα με την παρουσίαση αντιγόνων, την διέγερση κυτταροκινών και την ανοσοποιητική ρύθμιση του οργανισμού. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα προκαλούν προστατευτικές ανοσολογικές αποκρίσεις *in vitro*, χωρίς να επιφέρουν επιδράσεις κυτταροτοξικές σε θηλαστικά και ψάρια, αποδεικνύοντας την βιοσυμβατότητα που υπάρχει και τη πιθανότητα χρήσης των εξωσωμάτων αυτών ως φορείς μεταφοράς φαρμάκων ή ανοσοθεραπείες ακόμα και σε θηλαστικά ή και στον άνθρωπο. Η ικανότητα παράδοσης ανοσοτροποποιητικών miRNAs σε κύτταρα στόχους, υπογραμμίζει τις δυνατότητές τους για την ανάπτυξη ανοσοθεραπειών με βάση το RNA για να καταπολεμηθεί το RBIV στα ψάρια. Η παράδοση των ανοσοδιεγερτικών παραγόντων μέσω των εξωσωμάτων, θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων στο σύνολο μιας υδατοκαλλιέργειας [88].

Σχετικά με την διακυτταρική επικοινωνία, τα εξωσώματα από το πλάσμα του ψαριού έχουν κρίσιμο ρόλο για την μεταφορά βιομορίων στα κύτταρα που είναι στόχοι. Μπορεί να αναφερθεί ότι τα κυστίδια αυτά είναι φυσικοί φορείς ανοσορυθμιστικών σημάτων που επιτρέπουν στα κύτταρα να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στις περιβαλλοντικές αλλαγές που είναι ιδιαίτερα έντονες στα υδατικά συστήματα και έναντι των παθογόνων. Η πρωτεΐνη HSP90 είναι γεγονός ότι διαμορφώνει τις αποκρίσεις του ψαριού στο στρες και το βοηθάει στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Το φορτίο τους σε ρυθμιστικά μόρια miRNA είναι αποδεδειγμένο ότι ρυθμίζει τα μονοπάτια που έχουν εμπλοκή στην απόπτωση και την φλεγμονώδη σήμανση η οποία αποτελεί διεργασία ζωτικής σημασίας στην διατήρηση ακεραιότητας των ιστών στην διάρκεια των λοιμώξεων. Τα συγκεκριμένα εξωσώματα λοιπόν δρουν σαν διαβιβαστές που γεφυρώνουν την έμφυτη με την προσαρμοστική ανοσία και το βιοενεργό φορτίο τους αντανakλά την φυσιολογική κατάσταση των μητρικών κυττάρων [88].

Λόγω του μικρού μεγέθους των εξωσωμάτων στην τσιπούρα και λόγω της λιπιδικής στοιβάδας που έχουν, αυτά καθιστούνται κατάλληλοι φορείς για την μεταφορά αντιμικροβιακών πεπτιδίων, siRNA και εμβολίων. Η ικανότητά τους να ξεπερνάνε τους βιολογικούς φραγμούς καθώς και η ικανότητα τους να προστατεύουν το φορτίο τους από την ενζυμική αποικοδόμηση, ενισχύει την χρηστικότητα που μπορεί να έχουν ως φορείς για την χορήγηση φαρμάκων. Οι πρωτεϊνικοί μοναδικοί δείκτες στην επιφάνειά τους, επιτρέπουν να στοχεύουν συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, αναπτύσσοντας έτσι μια θεραπεία ακριβείας σε υδατοκαλλιέργειες. Με την ενθλάκωση αντι-ϊικών πεπτιδίων μέσα στα εξωσώματα, επιτυγχάνεται μια νέα προσέγγιση και μέθοδος για την αποτελεσματική καταπολέμηση παθογόνων ασθενειών που προκαλούνται από μικροοργανισμούς όπως το RBIV [88].



Εικόνα 33: Γραφική Περίληψη του μηχανισμού εξωσωμάτων του ψαριού Rock bream (Πηγή Εικόνας: [88]).

5.2.4 Σολωμός Ατλαντικού

Τα EVs προερχόμενα από τα ανοσοκύτταρα του σολομού, παρουσιάζουν μια επιλεκτική ομαδοποίηση των ρυθμιστικών μορίων miRNA, γεγονός που είναι ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό για την ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Από μελέτες αποκαλύφθηκε ότι κυστίδια από μονοπύρρηνα κύτταρα, μεταφέρουν και τα miRNAs που είναι εμπλεκόμενα στην πρόωμη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα ssa-miR-146a και ssa-miR-155, αλλά και στα κύτταρα που έχουν την μορφή μακροφάγων, μεταφέρουν τα ssa-miR-125b που είναι απαραίτητα για την λήξη φλεγμονών και την αναδιαμόρφωση των ιστών. Η διαδικασία της επιλεκτικής φόρτωσης των μορίων miRNA, επιτρέπει στα EVs να μεθοδεύουν στοχευμένα την διακυτταρική επικοινωνία του ανοσοποιητικού συστήματος, διευκολύνοντας συντονισμένα τον μηχανισμό άμυνας κατά των παθογόνων. Η παρακολούθηση της υδατοκαλλιεργικής υγείας, επιτυγχάνεται αφού παρέχονται πολύτιμοι βιοδείκτες μέσω της ανοσολογικής κατάστασης που αντανακλάται στα ψάρια μέσω των κυστιδίων αυτών [89].

Μεταξύ ξενιστή και παθογόνου διαμορφώνονται διάφορες αλληλεπιδράσεις στις οποίες σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα EVs και στη περίπτωση του σολομού του Ατλαντικού. Συγκεκριμένα, τα κυστίδια μεταφέρουν μοριακά πρότυπα PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) και μόρια που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα EVs που προκύπτουν από μακροφάγα προσβεβλημένα από παθογόνο διεγείρουν τα κύτταρα του αποδέκτη ώστε να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες σαν τις IL-1β, IFN-γ και TNF-α και αποτελεσματικά αυτές να βοηθούν στην απομάκρυνση των παθογόνων. Σαν πρόσθετη λειτουργία, τα EVs διευκολύνουν στην παρουσίαση ιϊκών αντιγόνων ευνοώντας την ενεργοποίηση των προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων [89].

Περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες των ψαριών όπως οι υψηλές θερμοκρασίες και τα υψηλά φορτία παθογόνων επηρεάζουν το φορτίο των miRNA στα EVs του ψαριού. Εκτράφηκαν σολομοί σε περιβάλλον υψηλής θερμοκρασίας και τα EVs που απομονώθηκαν από αυτούς παρουσίασαν προφίλ μορίων miRNA σχετικά με το στρες και τις μεταβολικές προσαρμογές. Τα χαρακτηριστικά αυτά μόρια miRNA μπορούν να δράσουν σαν δείκτες για την έγκαιρη προειδοποίηση αναταράξεων στο σύστημα της υδατοκαλλιέργειας, επιτρέποντας στους επαγγελματίες τις έγκαιρες παρεμβάσεις. Με την ενσωμάτωση των EVs-βιοδεικτών στα υδατοκαλλιεργικά συστήματα, αυξάνεται η πιθανότητα για την μείωση του περιβαλλοντικού στρες στα ψάρια αλλά και σε ολόκληρο το οικοσύστημα [89].

Εκτός της ανοσοποιητικής διαμόρφωσης, τα EVs από τον σολομό του Ατλαντικού προωθούν μηχανισμούς για την αναγέννηση ιστών και επούλωση πληγών. Εντός των συγκεκριμένων EVs, τα φορτία πρωτεϊνών και μορίων miRNA, συνδέεται με τις διαδικασίες επιδιόρθωσης κυττάρων, συμπεριλαμβάνοντας την αγγειογένεση και την αναδιαμόρφωση εξωκυτταρικής μήτρας. Με την αξιοποίηση των αναγεννητικών δυνατοτήτων των κυστιδίων αυτών, μπορεί να εξασφαλιστεί καλύτερη ευζωία στο σύνολο των εκτρεφόμενων ψαριών όπως και υψηλότερο ποσοστό ανάκαμψης από φυσικούς τραυματισμούς [89]. Το εργαλείο αυτό με τις κατάλληλες προσαρμογές, δυνητικά είναι υποσχόμενο για εφαρμογή και σε άλλους οργανισμούς όπως ο άνθρωπος.

5.2.5 Ιαπωνική Γλώσσα (Japanese Flounder)

Στην Ιαπωνική Γλώσσα προκαλούνται σημαντικές αποκρίσεις στρες κυτταρικά, όταν υπάρχει έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες θερμοκρασίες νερού από τα ηπατικά κύτταρα του οποίου απελευθερώνονται EVs. Τα συγκεκριμένα κυστίδια δρουν σαν φορείς μορίων που έχουν σχέση με το στρες, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSPs (Heat Shock Proteins) όπως έχει βρεθεί και σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, σηματοδοτικών RNAs και ενζύμων ROS (Reactive Oxygen Species) που μαζί αποκρίνονται συντονισμένα στο θερμικό στρες. Συγκεκριμένα, με τις πρωτεΐνες HSP90 και HSP70, μετριάζεται η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που προκαλούνται από το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εάν γίνει η μεταφορά αυτών των προστατευτικών

πρωτεϊνών στα γειτονικά κύτταρα, τότε μέσω των EVs διατηρείται η ομοιόσταση στους ιστούς και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα βλάβης σε συνθήκες απότομης ή σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας [90].

Όταν το ήπαρ της Ιαπωνικής Γλώσσας έχει υποστεί θερμική επιβάρυνση, παρουσιάζει έντονες ιστοπαθολογικές τροποποιήσεις, όπως η απόπτωση ηπατοκυττάρων, και η φλεγμονώδεις διήθηση. Σε αυτές τις ακραίες συνθήκες γίνεται απελευθέρωση των EVs, όπου φέρουν μοριακούς δείκτες που ρυθμίζουν τις ROS σαν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και την καταλάση (CAT) αλλά και ρυθμιστικά μόρια miRNA για την επιδιόρθωση βλαβών οξειδωτικού χαρακτήρα. Με την ανάλυση των EVs μεταγραφικά, έγινε γνωστή η ρύθμιση γονιδίων σαν το ATF4 και JNK που έχουν εμπλοκή στην μεταγραφική οδό της αναδιπλούμενης πρωτεϊνικής απόκρισης UPR (Unfolded Protein Response). Με την απελευθέρωση των EVs που έχουν χαρακτήρα μη επεμβατικών βιοδεικτών, είναι εμφανής η προσπάθεια του ήπατος για την συνολική κινητοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης [90].

Πιο ειδικά, η Ιαπωνική γλώσσα υποβλήθηκε σε πειραματικές διεργασίες για την έκκριση διαφορετικών προφίλ EVs σε καταστάσεις σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας GTR (Gradual Temperature Rise) και απότομης αύξησης της θερμοκρασίας ATR (Abrupt Temperature Rise). Σε περιβάλλον υπό ATR τα απελευθερωμένα ηπατικά EVs είναι εμπλουτισμένα με αποπτωτικούς δείκτες όπως ο TRAF2 και ο CHOP που δείχνει ότι ενεργοποιούνται προ-αποπτωτικά μονοπάτια. Αντιθέτως, σε GTR κατάσταση τα κυστίδια, μεταφέρουν μόρια που σκοπό έχουν να προάγουν την κυτταρική προσαρμογή. Τέτοια μόρια είναι πρωτεΐνες αποκρίσεων του στρες και αντι-αποπτωτικών ρυθμιστών. Η σημαντική αυτή διαφορά υποδηλώνει ότι μέσω της περίπτωσης GTR, η κυτταρική απόκριση είναι πολύ πιο ελεγχόμενη από την ATR που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Με την ποικιλομορφία των EVs σε αναλογία των περιβαλλοντικών συνθηκών γίνεται βαθιά κατανόηση μηχανισμών θερμικής προσαρμογής [90], που βοηθούν σε συνέχεια και στην κατανόηση τέτοιων μηχανισμών και στα θηλαστικά.

Η απελευθέρωση των EVs που επάγεται από τους μηχανισμούς στρες, εμφανίζει προοπτικές αξιοποίησης μοριακού φορτίου για την τόνωση της θερμικής ανοχής σε μια υδατοκαλλιέργεια. Στα εκτρεφόμενα ψάρια, αναπτύσσονται παρεμβάσεις που βελτιώνουν την ανθεκτικότητα στο στρες μέσω EV που είναι εμπλουτισμένα με μόρια miRNAs υπεύθυνα για τον ενεργειακό μεταβολισμό και πρωτεΐνες, υπεύθυνες για το οξειδωτικό στρες. Παραδειγματικά, η χρήση EVs συμπληρωματικά με τις τροφές μπορεί να βοηθήσει τα ψάρια για το πως αντιδρούν στις μεταβολικές και ανοσολογικές αποκρίσεις του θερμικού στρες. Σαν βιοδείκτες, τα EVs μπορούν να φανούν χρήσιμα στην ανίχνευση πρώιμων σημείων θερμικής βλάβης στον ιστό του ήπατος [90].

5.3 Εξωσώματα σχετικά με τον ιό της νευρικής νέκρωσης

5.3.1 Εισαγωγή

Ιός της νευρικής νέκρωσης ή απλούστερα NNV (Nervous Necrosis Virus), ονομάζεται ο αιτιολογικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για μια καταστροφική ασθένεια στις υδατοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο, την ιογενή νευρική νέκρωση (VNN: Viral Nervous Necrosis). Ο συγκεκριμένος RNA ιός δεν έχει εξωτερική διπλή στοιβάδα και προσβάλλει ψάρια τόσο του γλυκού νερού όσο και θαλάσσης, με την παθογένεια να σχετίζεται με σοβαρό νευρολογικά εκφυλιστικό χαρακτήρα. Στόχος του ιού είναι το ΚΝΣ, οδηγώντας αρχικά σε κινητική δυσλειτουργία και σε κενώσεις στα τμήματα του εγκεφάλου στα ψάρια, και με αποτέλεσμα σχεδόν 100% θνησιμότητα σε νεαρά ψάρια και προνύμφες. Παραπάνω από 120 είδη ψαριών είναι ευαίσθητα στον ιό πράγμα που τον καθιστά μεγάλη οικολογική και οικονομική απειλή. Στην διαχείριση της νόσου, η ανάπτυξη εμβολίων και η χορήγηση αντιβιοτικών έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα, οδηγώντας σε συνεχείς εστίες και προκλήσεις παγκοσμίως [91], [92], [93].

Ένα από τα ψάρια στα οποία έχει μελετηθεί διεξοδικά η αλληλεπίδραση μεταξύ των εξωσωμάτων και του NNV ιού είναι η πορτοκαλί σφυρίδα (*Epinephelus coioides*). Από τα κύτταρα των νεφρών της σφυρίδας προέρχονται εξωσώματα που κατά την διάρκεια της νόσου μεταφέρουν πρωτεΐνες από το περίβλημα του ιού διευκολύνοντας την εξάπλωσή του στα γειτονικά κύτταρα. Με την επιρροή του εξωσωματικού μηχανισμού, τα εξωσώματα που περιέχουν NNV παράγοντες, αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες ALIX και Snx27 του ξενιστή και αυξάνεται η παραγωγή τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει συνεργασία μεταξύ του μηχανισμού και των εξωσωμάτων στην διάδοση του ιού [93].

Όσα εξωσώματα απελευθερώνονται από τον ιό κατά την διάρκεια της λοίμωξης, τροποποιούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή βοηθώντας τον ιό να αποφύγει τις άμυνες του. Η πρωτεΐνη διαλογής Snx27 είναι προσδιορισμένη ως κρίσιμος ρυθμιστής των εξωσωματικών οδών και ρυθμίζει καθοδικά τις διαδικασίες που διεγείρονται από την ιντερφερόνη αναστέλλοντας τα μονοπάτια NF-κΒ και ISRE που είναι απαραίτητα στην ανοσία έναντι των ιών. Με αυτό το τρόπο, καταστέλλεται η παραγωγή των αντι-ϊκών κυτταροκινών και πρωτεϊνών δημιουργώντας ένα κυτταρικό περιβάλλον που είναι ευνοϊκό για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η παραμονή του NNV στον οργανισμό ενισχύεται από την δυνατότητά του να παρακάμπτει συμβατικούς μηχανισμούς ανίχνευσης ανοσοποιητικού συστήματος [91], [93].

Παρά το γεγονός ότι τα εξωσώματα υποστηρίζουν την παθογένεια του NNV, ενέχουν επίσης δυνατότητες σαν αντι-ϊκοί παράγοντες. Σε τελεόστεα ψάρια, έγιναν μελέτες οι οποίες αποκαλύπτουν ότι τα εξωσώματα έχουν την δυνατότητα αναστολής του ιϊκού πολλαπλασιασμού αφού μεταφέρουν πρωτεΐνες του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος όπως η πρωτεΐνη αντίστασης του μυξοϊού-1 (Mx-

1). Στον ορό τον τελεόστεων, τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με Mx-1 και έχουν αποδείξει την ικανότητα τους να εσωτερικεύονται σε κύτταρα δέκτες και να καταστέλλουν την αντιγραφή συγγενών ιών σαν τον ISKNV. Με τον συγκεκριμένο αντιϊκό μηχανισμό αναδεικνύεται η χρήση των εξωσωμάτων σαν φορείς θεραπευτικών μορίων έναντι του NNV, και παρεμφερών παθογόνων σε περιβάλλοντα υδατοκαλλιέργειας [91].



Εικόνα 34: Κλινικά συμπτώματα σε VNN: υπερτονισμός της κολυμβητικής κύστης (αριστερά) και κοιλιακή επέκταση (δεξιά) σε μολυσμένη *Lisa Aurata* στην Κασπία Θάλασσα (Πηγή Εικόνας: [94]).

5.4 Εξωσώματα μη προερχόμενα από ψάρια για την καταπολέμηση ασθενειών τους

5.4.1 Ψάρι Medeka

Οι δυνατότητες που έχουν τα εξωσώματα για την άμβλυνση των τοξικολογικών και περιβαλλοντικών προκλήσεων καταδεικνύονται έμπρακτα από μελέτες σε ψάρια medeka (*Oryzias latipes*). Ένα υπόδειγμα σχετικά με την έκθεση της ιχθυοκαλλιέργειας σε κάδμιο (Cd) αποκάλυψε τις δυσμενείς επιπτώσεις που έχουν τα βαρέα μέταλλα σε όργανα όπως ήπαρ, οστά και νεφροί. Μετά από χρόνια έκθεση, τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των οργανισμών, παραμόρφωση στα οστά, και βλάβη στα μιτοχονδριακά σωληνάρια των νεφρών. Καθορισμένα εξωσώματα προερχόμενα από ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (hBM-MSCs) χορηγήθηκαν ενδοφλέβια για την αντιμετώπιση αυτών των επιπτώσεων. Τα εξωσώματα αυτά είναι φορτωμένα με βιομόρια όπως miRNAs, και πρωτεΐνες, επιδιορθώνοντας αποτελεσματικά τις μεμβράνες των νεφρικών κυττάρων όπως και αποκαθιστώντας την μιτοχονδριακή λειτουργία. Σε αυτό το μοντέλο, η συσσώρευση του Cd είναι εξαρτώμενη από την ηλικία και το φύλο, και παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν διαφοροποιημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ θεραπειών με βάση τα εξωσώματα και την φυσιολογία του δέκτη, και έτσι το σύστημα ιχθυοκαλλιέργειών του ψαριού medeka, το καθιστά σύστημα δοκιμής παρεμβάσεων έναντι περιβαλλοντικών τοξινών [95].

Οι επισκευαστικές ικανότητες των εξωσωμάτων επεκτείνονται σε πλήθος κακώσεων που προκαλούνται από κάδμιο στα ψάρια medeka, δείχνοντας αναγεννητική ικανότητα. Τα εξωσώματα

πέραν του ότι αποκατέστησαν την κυτταρική αρχιτεκτονική, ανακούφισαν επίσης τις συστηματικές βλάβες όπως σκελετικές παραμορφώσεις που προέκυψαν κυρίως σε γηραιά θηλυκά που εκτίθηκαν σε Cd. Μέσω προηγμένων μεθόδων καθαρισμού, τα εξωσώματα διατήρησαν την θεραπευτική αποτελεσματικότητά τους, περιορίζοντας παράλληλα την μόλυνση από εξωτερικές πρωτεΐνες. Ιστολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι με την χρήση δεικτών φθορισμού, επιτεύχθηκε δομική βελτίωση στους ιστούς. Συμπερασματικά λοιπόν, οι δυνατότητες των εξωσωμάτων ως θεραπευτικές μέθοδοι, επεκτείνονται όχι μόνο στην τοξικότητα βαρέων μετάλλων αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας [95].

5.4.2 Τιλάπια του Νείλου (Nile Tilapia)

Η φραγκισέλλωση είναι μια ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Francisella orientalis* και αποτελεί βασική απειλή για το είδος Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) αφού εμφανίζει πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στα νοσούντα ψάρια και λίγες επιλογές θεραπείας. Μία εξ' αυτών είναι η χρήση OMVs (outer membrane vesicles αντίστοιχα των EVS, αλλά προερχόμενα από βακτήρια) προερχόμενα από παθογόνα για την χρήση τους δυνητικά ως εμβόλια. Τα OMVs που περιέχουν πρωτεΐνες και RNA, αξιολογούνται ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις στην τιλάπια χωρίς όμως να προκαλούν τοξικότητα. Σε δοκιμές με ενδοπεριτονιακή έγχυση, φάνηκε πως επηρεάζεται η έκφραση γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα στην ρύθμιση των προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Παρόλα αυτά, η ανοσία δεν ήταν σταθερή και έτσι απαιτούνται επιπλέον τροποποιήσεις σχετικά με την συγκέντρωση και την μορφοποίηση των OMVs [96].

5.4.3 Μπακαλιάρος Ατλαντικού

Στο είδος του μπακαλιάρου Ατλαντικού (*Gadus morhua*) οι χρόνιες λοιμώξεις από *Francisella noatunensis* που προκαλεί μια απαιτητική ασθένεια, είναι δύσκολες να αντιμετωπιστούν. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα OMVs διερευνούνται για την δημιουργία εμβολίων. Στο πλήθος των ψαριών που τους χορηγήθηκε ένεση OMVs προερχόμενα από τον μικροοργανισμό, παρουσίασαν αλλαγές σε ανοσολογικούς δείκτες στον σπλήνα, συμπεριλαμβανομένης και της ρύθμισης γονιδίων σχετικά με την φλεγμονή και την προσαρμοστική ανοσία. Βοηθητικές ουσίες όπως το ανοσοενισχυτικό Montanide ISA, ενίσχυσε στην παραπάνω αποτελεσματικότητα ανοσοποίησης. Παρόλα αυτά, οι δοκιμές που έγιναν έδειξαν ποικιλομορφία ανάμεσα σε είδη ψαριού του μπακαλιάρου και διαφορετικών ειδών όπως για παράδειγμα το zebrafish. Έτσι υπογραμμίζεται η σημασία της προσαρμογής των εμβολίων με εξωσώματα ανάλογα τα χαρακτηριστικά του είδους ξενιστή και την εκτεταμένη σκιαγράφηση της ανοσολογικής απόκρισης [96].

5.4.4 Ιριδίζουσα Πέστροφα

Τα OMVs που προέρχονται από τον *Bacillus subtilis*, έχουν δείξει ότι ασκούν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις στην ιριδίζουσα Πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), αναδεικνύοντας τις δυνατότητές τους σε υδατοκαλλιέργεια. Τα συγκεκριμένα κυστίδια είναι νανοκλίμακας, και χαρακτηριστικό τους είναι μια διπλοστοιβάδα αποτελούμενη από λιπίδια, και το γεγονός ότι μπορούν να μεταφέρουν βιοδραστικά μόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεικά οξέα, επιτρέποντας να ασκούν επιρροή στις λειτουργίες του ξενιστή. Στην πέστροφα έχει παρατηρηθεί ότι τα OMVs του *B. subtilis* διαμορφώνουν την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονές σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και λευκοκύτταρα σπλήνας. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1β και η IL-8, μαζί με αντιμικροβιακά πεπτίδια σαν την καθελικιδίνη 2, αποκρίθηκαν στην έκθεση σε OMVs, γεγονός που έδειξε τον ρόλο τους στην ενίσχυση της άμυνας του βλεννογόνου [97].

Σε περαιτέρω διερεύνηση για τις ιδιότητες των OMVs, αποκαλύφθηκε η ιδιότητά τους να επηρεάζουν την δυναμική των B – λεμφοκυττάρων στον σπλήνα. Συγκεκριμένα, ο αριθμός κυττάρων που εκκρίνουν IgM αυξήθηκε, και ταυτόχρονα προωθήθηκε η διαφοροποίηση των πρώιμων B – λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και πλασματοβλάστες. Μαζί με την επίδραση αυτή φάνηκε η ενισχυμένη ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων αφού αυξήθηκε η έκφραση του MHC II σε B – λεμφοκύτταρα, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και κύτταρα που εκφράζουν IgM, IgD αντιγόνα. Με τον τρόπο αυτό, σηματοδοτείται μια πρόοδος στην κατανόηση του ανοσοδιεγερτικού δυναμικού των Gram-θετικών βακτηριακών OMVs αφού πέρα από την ενεργοποίηση των χυμικών αποκρίσεων γίνεται εύκολη παρουσίαση αντιγόνων [97].

Πέρα από την επίδραση που έχουν στην μεταγραφή ανοσοποιητικών γονιδίων, τα OMVs από το *B. Subtilis*, ρυθμίζουν την ομοιοστάση και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού. Τα γονίδια *claudin-3* και *zonula occludens-1* σε συνδυασμό με την παραγωγή μουκίνης, ρυθμίστηκαν διαφορετικά αφού τα OMVs διατηρούν την λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού. Με την συγκεκριμένη διαμόρφωση, ενισχύεται η ανθεκτικότητα του εντέρου απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς από τις ανοσολογικές επιδράσεις που προκαλούν τα κυστίδια. Αυτές οι παρεμβάσεις μπορούν να γίνουν με διαιτητικό ή βλεννογονικό τρόπο και να αυξηθεί η ανθεκτικότητα στις ασθένειες σε διάφορα είδη ψαριών στις υδατοκαλλιέργειες [97].

6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

6. Συμπεράσματα – Συζήτηση

6.1 Σύνοψη Συμπερασμάτων

Τα εξωσώματα έχουν εξελιχθεί σαν σημαντικοί ρυθμιστές στην διακυτταρική επικοινωνία τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στις διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Στα ψάρια συγκεκριμένα, το γεγονός ότι εμπλέκονται ενεργά στις επιδράσεις ξενιστή – παθογόνου με την μεταφορά βιομορίων τα καθιστούν εργαλείο επιρροής της φυσιολογίας του ξενιστή και της επιβίωσης του παθογόνου. Μέσω της βιβλιογραφία γίνεται αντιληπτό ότι τα εξωσώματα έχουν δυνατότητες λειτουργίας σαν φορείς σηματοδότησης για την ενεργοποίηση ή την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος στον ξενιστή, και η κατανόηση του ρόλου τους δίνει πολύτιμη γνώση στην ανοσοβιολογία των ψαριών. Εν κατακλείδι, η χρήση εξωσωμάτων για την διάγνωση ασθενειών και την μεταφορά θεραπευτικών ουσιών, δίνει πολλές προοπτικές στις ιχθυοκαλλιέργειες, την βιομηχανία μεγάλης σημασίας έναντι στην απειλή του επισιτισμού.

6.2 Συζήτηση ευρημάτων

6.2.1 Ρυθμιστές Ανοσοποιητικού

Κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση των ψαριών έχουν τα εξωσώματα που μέσω της βιομοριακής μεταφοράς προωθείτε είτε η ανοσοκαταστολή είτε η ανοσολογική άμυνα, και έτσι τα καθιστούν κρίσιμα στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Σε μολυσματικές καταστάσεις, μπορεί να περιβάλλουν τα μόρια που ενεργοποιούν μηχανισμούς για την άμυνα του οργανισμού. Από την άλλη πλευρά στα παθογόνα, ο κεντρικός ρόλος είναι η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, επομένως η ρύθμιση μέσω εξωσωμάτων της ανοσολογικής απόκρισης σε περίπτωση ασθενειών, είναι επιρρεπής και με την έρευνα και τη γνώση, μπορούμε να την μετατοπίσουμε προς τη μεριά καταπολέμησης των ασθενειών.

6.2.2 Διαφοροποίηση στα Ψάρια

Στα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας, η εντατική διαβίωση που τους προσφέρει έκθεση σε παθογόνους μικροοργανισμούς, παρουσιάζονται διαφοροποιημένες ανοσολογικές αποκρίσεις σχετικά με την λειτουργία εξωσωμάτων, σε σχέση με τα άγρια ψάρια. Μέσω της ποικιλομορφίας αυτής, η διαφοροποίηση υπάρχει και στην σύνθεση και την λειτουργικότητα των εξωσωμάτων.

6.3 Περιορισμοί Έρευνας

Υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί που δυσκολεύουν την περαιτέρω μελέτη και κατανόηση της βιολογίας των εξωσωμάτων. Η πλειοψηφία της έρευνας των εξωσωμάτων είναι επικεντρωμένη στην μελέτη για θηλαστικά και υπάρχει κενό στην γνώση για τα ψάρια. Επίσης, η απομόνωση καθαρών πληθυσμών

εξωσωμάτων από ιστούς ή βιολογικά υγρά (πχ. πλάσμα) είναι πολύ τεχνικά απαιτητική στα ψάρια. Τέλος, λόγω της περιορισμένης *in vivo* λειτουργίας των εξωσωμάτων, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση στους μηχανισμούς λειτουργικότητάς τους.

6.4 Προοπτικές για το μέλλον

Είναι αναγκαία η διεξαγωγή περισσότερων μελετών και η χρήση σύγχρονων τεχνολογιών για την περαιτέρω εξέταση της μοριακής σύνθεσης εξωσωμάτων, και πως αντιδρούν στις παθολογικές καταστάσεις. Μέσω των μελετών αυτών, ανοίγονται καινούργιοι δρόμοι για την χρήση καινοτόμων εφαρμογών στην υδατοκαλλιέργεια. Η χρήση τους σαν βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων και η δυνατότητα να είναι φυσικοί φορείς σε θεραπευτικές ουσίες μειώνει την ανάγκη για την χορήγηση αντιβιοτικών. Παράλληλα, η έρευνα για το ρόλο εξωσωμάτων στα ψάρια και στις υδατοκαλλιέργειες αναδεικνύει τεχνικές και εργαλεία που μπορούν να εφαρμοστούν στα θηλαστικά και στον άνθρωπο με τις κατάλληλες μετατροπές. Με την κατανόηση μηχανισμών που εγείρονται μέσω των κυστιδίων στα ψάρια, δίνεται έμφαση για μελέτη σε αντίστοιχους μηχανισμούς που πρέπει να ερευνηθούν και να αξιοποιηθούν στην περίπτωση λοιμωδών ασθενειών στον άνθρωπο. Τέλος, στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας και λόγω του ρόλου των υδάτινων περιβάλλοντων στην κυκλοφορία και μετάδοση των ασθενειών μεταξύ οργανισμών αλλά και στην ανάπτυξη της αντιμικροβιακής αντοχής, η έρευνα για το ρόλο των εξωσωμάτων στα ψάρια και ειδικά σε περιπτώσεις λοιμώξεων των ψαριών, είναι καίριας σημασίας και για τον άνθρωπο για την ανάδειξη και αντιμετώπιση των μηχανισμών απελευθέρωσης των εξωσωμάτων στα περιβάλλοντα αυτά. Παράλληλα, η έρευνα αυτή θα αναδείξει περιβαλλοντικούς βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση της AMR και της μετάδοσης ασθενειών μεταξύ ειδών και της ανάκαμψης μετάδοσης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή αντίσταση μέσω αυτών των εξωσωμάτων αυτών στο περιβάλλον και στην κάθετη μετάδοση μεταξύ των οργανισμών.

Βιβλιογραφία

1. Malenica M, Vukomanović M, Kurtjak M, Masciotti V, Dal Zilio S, Greco S, Lazzarino M, Krušić V, Perčić M, Jelovica Badovinac I, Wechtersbach K, Vidović I, Baričević V, Valić S, Lučin P, Kojc N, Grabušić K. Perspectives of Microscopy Methods for Morphology Characterisation of Extracellular Vesicles from Human Biofluids. *Biomedicines*. 2021 May 26;9(6):603. doi: 10.3390/biomedicines9060603.
2. Dispertech.com/Extracellular vesicle biogenesis.
3. Kurtjak M, Kereiche S, Klepac D, Križan H, Perčić M, Krušić Alić V, Lavrin T, Lenassi M, Wechtersbach K, Kojc N, Vukomanović M, Zrna S, Biberić M, Domitrović R, Grabušić K, Malenica M. Unveiling the Native Morphology of Extracellular Vesicles from Human Cerebrospinal Fluid by Atomic Force and Cryogenic Electron Microscopy. *Biomedicines*. 2022 May 27;10(6):1251. doi: 10.3390/biomedicines10061251.
4. Chang WH, Cerione RA, Antonyak MA. Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol*. 2021;2174:143-170. doi: 10.1007/978-1-0716-0759-6_10.
5. Tao, SC., Guo, SC. Role of extracellular vesicles in tumour microenvironment. *Cell Commun Signal* 18, 163 (2020). doi: 10.1186/s12964-020-00643-5
6. Mattia I Morandi, Petro Busko, Efrat Ozer-Partuk, Suman Khan, Giulia Zarfati, Yael Elbaz-Alon, Paula Abou Karam, Tina Napso Shogan, Lana Ginini, Ziv Gil, Neta Regev-Rudzki, Ori Avinoam, Extracellular vesicle fusion visualized by cryo-electron microscopy, *PNAS Nexus*, Volume 1, Issue 4, September 2022, pgac156, doi: 10.1093/pnasnexus/pgac156
7. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019 Jul 15;8(7):727. doi: 10.3390/cells8070727.
8. Lahiri, D., Nag, M., Dey, A. et al. Exosome-associated host–pathogen interaction: a potential effect of biofilm formation. *J Anal Sci Technol* 12, 54 (2021). doi: 10.1186/s40543-021-00306-1
9. Krylova SV, Feng D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 10;24(2):1337. doi: 10.3390/ijms24021337.
10. Koh, S.; Noda, S.; Taguchi, S. Population Dynamics in the Biogenesis of Single-/Multi-Layered Membrane Vesicles Revealed by Encapsulated GFP-Monitoring Analysis. *Appl. Microbiol*. 2023, 3, 1027-1036. doi: 10.3390/applmicrobiol3030070

11. Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 6;17(2):171. doi: 10.3390/ijms17020171.
12. Schwarzenbach H, Gahan PB. Exosomes in Immune Regulation. *Noncoding RNA.* 2021 Jan 8;7(1):4. doi: 10.3390/ncrna7010004.
13. Zhang, J., Shi, W., Qu, D. et al. Extracellular vesicle therapy for traumatic central nervous system disorders. *Stem Cell Res Ther* 13, 442 (2022). doi: 10.1186/s13287-022-03106-5.
14. Kalluri R, McAndrews KM. The role of extracellular vesicles in cancer. *Cell.* 2023 Apr 13;186(8):1610-1626. doi: 10.1016/j.cell.2023.03.010.
15. Scioli MG, Terriaca S, Fiorelli E, Storti G, Fabbri G, Cervelli V, Orlandi A. Extracellular Vesicles and Cancer Stem Cells in Tumor Progression: New Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 29;22(19):10572. doi: 10.3390/ijms221910572
16. Sohal IS and Kasinski AL (2023) Emerging diversity in extracellular vesicles and their roles in cancer. *Front. Oncol.* 13:1167717. doi: 10.3389/fonc.2023.1167717.
17. Marzan AL, Stewart SE. Elucidating the Role of Extracellular Vesicles in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Nov 12;13(22):5669. doi: 10.3390/cancers13225669.
18. Fu, S., Zhang, Y., Li, Y. et al. Extracellular vesicles in cardiovascular diseases. *Cell Death Discov.* 6, 68 (2020). doi: 10.1038/s41420-020-00305-y
19. Chong SY, Lee CK, Huang C, Ou YH, Charles CJ, Richards AM, Neupane YR, Pavon MV, Zharkova O, Pastorin G, Wang JW. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Alternative Biomarker Sources, Therapeutic Agents, and Drug Delivery Carriers. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 3;20(13):3272. doi: 10.3390/ijms20133272.
20. Liu Chunping , Bayado Nathan , He Dongyue , Li Jie , Chen Huiqi , Li Longmei , Li Jinhua, Long Xinyao , Du Tingting , Tang Jing , Dang Yue , Fan Zhijin , Wang Lei , Yang Phillip C. Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles for Myocardial Repair, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 2021. doi:10.3389/fcvm.2021.758050
21. Herrmann, I.K., Wood, M.J.A. & Fuhrmann, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat. Nanotechnol.* 16, 748–759 (2021). doi: 10.1038/s41565-021-00931-2
22. Wang L, Yu X, Zhou J, Su C. Extracellular Vesicles for Drug Delivery in Cancer Treatment. *Biol Proced Online.* 2023 Nov 9;25(1):28. doi: 10.1186/s12575-023-00220-3.

23. Nowak M, Górczyńska J, Kołodzińska K, Rubin J, Choromańska A. Extracellular Vesicles as Drug Transporters. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 17;24(12):10267. doi: 10.3390/ijms241210267.
24. Fan SJ, Chen JY, Tang CH, Zhao QY, Zhang JM, Qin YC. Edible plant extracellular vesicles: An emerging tool for bioactives delivery. *Front Immunol.* 2022 Dec 8;13:1028418. doi: 10.3389/fimmu.2022.1028418
25. Fan, Y., Chen, Z. & Zhang, M. Role of exosomes in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of central nervous system diseases. *J Transl Med* 20, 291 (2022). doi: 10.1186/s12967-022-03493-6.
26. Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8, 15287 (2017). doi: 10.1038/ncomms15287
27. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol.* 2015 May 4;6:203. doi: 10.3389/fimmu.2015.00203.
28. Domingues Helena S. , Falcão Ana Mendanha , Mendes-Pinto Inês , Salgado António J. , Teixeira Fábio G. Exosome Circuitry During (De)(Re)Myelination of the Central Nervous System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology: Volume 8*, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.00483.
29. Bai K, Li X, Zhong J, Ng EHY, Yeung WSB, Lee CL, Chiu PCN. Placenta-Derived Exosomes as a Modulator in Maternal Immune Tolerance During Pregnancy. *Front Immunol.* 2021 May 11;12:671093. doi: 10.3389/fimmu.2021.671093.
30. Mincheva-Nilsson, L. (2010). Placental exosome-mediated immune protection of the fetus: feeling groovy in a cloud of exosomes. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 5, 619-634
31. Bin Zhang, Xiaodan Wu, Xu Zhang, Yaoxiang Sun, Yongmin Yan, Hui Shi, Yanhua Zhu, Lijun Wu, Zhaoji Pan, Wei Zhu, Hui Qian, Wenrong Xu, Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Exosomes Enhance Angiogenesis Through the Wnt4/ β -Catenin Pathway, *Stem Cells Translational Medicine*, Volume 4, Issue 5, May 2015, Pages 513–522, doi: 10.5966/sctm.2014-0267.
32. Di Bella MA. Overview and Update on Extracellular Vesicles: Considerations on Exosomes and Their Application in Modern Medicine. *Biology (Basel).* 2022 May 24;11(6):804. doi: 10.3390/biology11060804
33. Tumor Exosomes: A Messenger for Cancer Progression / *European Biotechnology*
27 June 2023.
34. Zhou Y, Zhang Y, Gong H, Luo S, Cui Y. The Role of Exosomes and Their Applications in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 11;22(22):12204. doi: 10.3390/ijms222212204.

35. Soltész B, Buglyó G, Németh N, Szilágyi M, Pös O, Szemes T, Balogh I, Nagy B. The Role of Exosomes in Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 21;23(1):8. doi: 10.3390/ijms23010008.
36. Santos P, Almeida F. Role of Exosomal miRNAs and the Tumor Microenvironment in Drug Resistance. *Cells.* 2020 Jun 11;9(6):1450. doi: 10.3390/cells9061450.
37. Jung KO, Youn H, Lee CH, Kang KW, Chung JK. Visualization of exosome-mediated miR-210 transfer from hypoxic tumor cells. *Oncotarget.* 2017 Feb 7;8(6):9899-9910. doi: 10.18632/oncotarget.14247.
38. Olejars W, Kubiak-Tomaszewska G, Chrzanowska A, Lorenc T. Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 14;21(16):5840. doi: 10.3390/ijms21165840.
39. Tian, W., Lei, N., Zhou, J. et al. Extracellular vesicles in ovarian cancer chemoresistance, metastasis, and immune evasion. *Cell Death Dis* 13, 64 (2022). doi: /10.1038/s41419-022-04510-8
40. Liu Y, Li X, Zhang T, Liu G. The Roles of Exosomes in Ovarian Cancer Chemo-resistance. *J Cancer.* 2023 Jul 9;14(11):2128-2144. doi: 10.7150/jca.84930.
41. Musi A, Bongiovanni L. Extracellular Vesicles in Cancer Drug Resistance: Implications on Melanoma Therapy. *Cancers (Basel).* 2023 Feb 8;15(4):1074. doi: 10.3390/cancers15041074
42. Guo Y, Ji X, Liu J, Fan D, Zhou Q, Chen C, Wang W, Wang G, Wang H, Yuan W, Ji Z, Sun Z. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors. *Mol Cancer.* 2019 Mar 11;18(1):39. doi: 10.1186/s12943-019-0995-1
43. Akoto T, Saini S. Role of Exosomes in Prostate Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 29;22(7):3528. doi: 10.3390/ijms22073528.
44. Gao, Zhengfan & Pang, Bairen & Li, Jing & Gao, Na & Fan, Tianli & li, Yong. (2021). Emerging Role of Exosomes in Liquid Biopsy for Monitoring Prostate Cancer Invasion and Metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 9. 679527. doi: 10.3389/fcell.2021.679527
45. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Rüger R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017 Jan 2;14(1):1-15. doi: 10.21873/cgp.20015.
46. Tominaga, N., Kosaka, N., Ono, M. et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood–brain barrier. *Nat Commun* 6, 6716 (2015) doi: 10.1038/ncomms7716.
47. Oliveira FD, Castanho MARB, Neves V. Exosomes and Brain Metastases: A Review on Their Role and Potential Applications. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 8;22(19):10899. doi: 10.3390/ijms221910899

48. Peng, Y., Zhao, M., Hu, Y. et al. Blockade of exosome generation by GW4869 inhibits the education of M2 macrophages in prostate cancer. *BMC Immunol* 23, 37 (2022). doi:10.1186/s12865-022-00514-3
49. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. Emerging Role of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Infectious and Inflammatory Bowel Diseases. *Cells*. 2020 Apr 30;9(5):1111. doi: 10.3390/cells9051111.
50. Guo J, Zhong L, Momeni MR. MicroRNA-155 and its exosomal form: Small pieces in the gastrointestinal cancers puzzle. *Cell Biol Toxicol*. 2024 Sep 16;40(1):77. doi: 10.1007/s10565-024-09920-2.
51. Kurywchak, P., Tavormina, J. & Kalluri, R. The emerging roles of exosomes in the modulation of immune responses in cancer. *Genome Med* 10, 23 (2018). doi:10.1186/s13073-018-0535-4
52. Gangadaran P, Madhyastha H, Madhyastha R, Rajendran RL, Nakajima Y, Watanabe N, Velikkakath AKG, Hong CM, Gopi RV, Muthukalianan GK, Valsala Gopalakrishnan A, Jeyaraman M, Ahn BC. The emerging role of exosomes in innate immunity, diagnosis and therapy. *Front Immunol*. 2023 Jan 16;13:1085057. doi: 10.3389/fimmu.2022.1085057.
53. Peng Y, Yang Y, Li Y, Shi T, Luan Y and Yin C (2023) Exosome and virus infection. *Front. Immunol*. 14:1154217. doi: 10.3389/fimmu.2023.1154217.
54. Crenshaw BJ, Gu L, Sims B, Matthews QL. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J*. 2018 Sep 28;12:134-148. doi: 10.2174/1874357901812010134.
55. Liu Z, Li Y, Wang Y, Bai X, Zhang Y. Exosomes in HBV infection. *Clin Chim Acta*. 2023 Jan 1;538:65-69. doi: 10.1016/j.cca.2022.11.012
56. Patman G. Hepatitis: Exosomal route of HCV transmission exists in patients. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Dec;11(12):704. doi: 10.1038/nrgastro.2014.179
57. Zou J, Peng H, Liu Y. The Roles of Exosomes in Immunoregulation and Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol*. 2021 Nov 15;12:757674. doi:10.3389/fimmu.2021.757674.
58. Samavati SF, Yarani R, Kiani S, HoseinKhani Z, Mehrabi M, Levitte S, Primavera R, Chetty S, Thakor AS, Mansouri K. Therapeutic potential of exosomes derived from mesenchymal stem cells for treatment of systemic lupus erythematosus. *J Inflamm (Lond)*. 2024 Jun 12;21(1):20. doi: 10.1186/s12950-024-00381-2.

59. Shen J, Zhang M, Peng M. Progress of exosome research in systemic lupus erythematosus. *Cytokine X*. 2022 May 21;4(2-3):100066. doi: 10.1016/j.cytex.2022.100066
60. Pistono C, Osera C, Cuccia M, Bergamaschi R. Roles of Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: From Pathogenesis to Potential Tools as Biomarkers and Therapeutics. *Sclerosis*. 2023; 1(2):91-112. doi: 10.3390/sclerosis1020011
61. WHO/EURO:2024-9510-49282-73655.
62. ECDC One Health Framework.
63. Sara Soto González, One Health: How to Achieve Optimal Health for People, Animals and Our Planet. *isglobal.org*
64. Cross-agency knowledge for One Health action. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Chemicals Agency (ECHA), European Environment Agency (EEA), European Food Safety Authority (EFSA), European Medicines Agency (EMA).
65. WHO Manifesto for a Healthy Recovery from COVID-19.
66. Hailat E, Amiri M, Debnath N, Rahman M, Nurul Islam M, Fatima Z, Khader Y, Al Nsour M. Strengthening the One Health Approach in the Eastern Mediterranean Region. *Interact J Med Res*. 2023 Mar 21;12:e41190. doi: 10.2196/41190.
67. Kaswa, Ramprakash & Von Pressentin, Klaus & Nair, Arun & Murphy, Shane. (2023). One World, One Health: A growing need for an integrated global health approach. *South African family practice : official journal of the South African Academy of Family Practice/Primary Care*. 65. e1-e2. 10.4102/safp.v65i1.5693.
68. O'Brien E, Xagorarakis I. A water-focused one-health approach for early detection and prevention of viral outbreaks. *One Health*. 2019 Apr 20;7:100094. doi: 10.1016/j.onehlt.2019.100094.
69. Hepatitis E, Kamar, Nassim et al. *The Lancet*, Volume 379, Issue 9835, 2477 – 2488
70. Naddeo V. One planet, one health, one future: The environmental perspective. *Water Environ Res*. 2021 Sep;93(9):1472-1475. doi: 10.1002/wer.1624. Epub 2021 Aug 24.
71. Krivoňáková, Nad'a & Šoltýsová, Andrea & Tamáš, Michal & Takáč, Zdenko & Krahulec, Ján & Ficek, Andrej & Gál, Miroslav & Gall, Marián & Fehér, Miroslav & Krivjanská, Anna & Horáková, Ivana & Belišová, Noemi & Bimová, Paula & Butor Skulcova, Andrea & Mackuľak, Tomáš. (2021). Mathematical modeling based on RT-qPCR analysis of SARS-CoV-2 in wastewater as a tool for epidemiology. *Scientific Reports*. 11. 10.1038/s41598-021-98653-x

72. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*. 2018 Mar;6(2):10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
73. Velazquez-Meza ME, Galarde-López M, Carrillo-Quiróz B, Alpuche-Aranda CM. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Vet World*. 2022 Mar;15(3):743-749. doi: 10.14202/vetworld.2022.743-749. Epub 2022 Mar 28.
74. Muteeb, G.; Rehman, M.T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 1615. doi: 10.3390/ph16111615
75. Pinto Jimenez CE, Keestra S, Tandon P, Cumming O, Pickering AJ, Moodley A, Chandler CIR. Biosecurity and water, sanitation, and hygiene (WASH) interventions in animal agricultural settings for reducing infection burden, antibiotic use, and antibiotic resistance: a One Health systematic review. *Lancet Planet Health*. 2023 May;7(5):e418-e434. doi: 10.1016/S2542-5196(23)00049-9.
76. Walsh, T.R. A one-health approach to antimicrobial resistance. *Nat Microbiol* 3, 854–855 (2018). doi: 10.1038/s41564-018-0208-5
77. OECD (2023), Embracing a One Health Framework to Fight Antimicrobial Resistance, OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/ce44c755-en.
78. Karun, A., Kaur, R.J., Charan, J. et al. Impact of COVID-19 on Antimicrobial Resistance in Paediatric Population: a Narrative Review. *Curr Pharmacol Rep* 8, 365–375 (2022). doi: 10.1007/s40495-022-00298-5
79. Ecosystems Mission Area, March 21 2024, The USGS One Health Approach to Infectious Diseases of Wildlife and Environmental Change
80. Tiwari A, Meriläinen P, Lindh E, Kitajima M, Österlund P, Ikonen N, Savolainen-Kopra C, Pitkänen T. Avian Influenza outbreaks: Human infection risks for beach users - One health concern and environmental surveillance implications. *Sci Total Environ*. 2024 Sep 15;943:173692. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173692
81. Samantha Serrano, September 13, 2022, Aquaculture & Antimicrobial Resistance.
82. Grant Stentiford, 3 August 2020, One Health Aquaculture, marinescience.blog.gov.uk
83. Gozlan Rodolphe Elie, Bommarito Claudia, Caballero Huertas Marta, Givens Justina, Mortillaro Jean-Michel, Pepey Elodie, Ralien Purco Ralairison, Senff Paula, Combe Marine. 2024. A one-health

approach to non-native species, aquaculture, and food security. *Water Biology and Security*, 33 (2):100250, 16 p. doi.: 10.1016/j.watbs.2024.100250.

84. Zhao, Na & Deng, Qiuxia & Zhu, Chunhua & Zhang, Bo. (2021). Application of Extracellular Vesicles in Aquatic Animals: A Review of the Latest Decade. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 30. 1-20. 10.1080/23308249.2021.1985429.

85. Biagini V, Busi F, Anelli V, Kerschbamer E, Baghini M, Gurrieri E, Notarangelo M, Pesce I, van Niel G, D'Agostino VG, Mione M. Zebrafish Melanoma-Derived Interstitial EVs Are Carriers of ncRNAs That Induce Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022 May 14;23(10):5510. doi: 10.3390/ijms23105510.

86. Aaron Hua, 2019, January 8, RAS: Targeting the Impossible

87. Jayathilaka EHTT, Edirisinghe SL, De Zoysa M, Nikapitiya C. Exosomes derived from olive flounders infected with *Streptococcus parauberis*: Proteomic analysis, immunomodulation, and disease resistance capacity. *Fish Shellfish Immunol*. 2024 May;148:109478. doi: 10.1016/j.fsi.2024.109478.

88. Nikapitiya, C., Jayathilaka, E. H. T. T., Edirisinghe, S. L., Rajapaksha, D. C., Wasana, W. P., Jayasinghe, J. N. C., & De Zoysa, M. (2022). Isolation and Characterization of Plasma-Derived Exosomes from the Marine Fish Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) by Two Isolation Techniques. *Fishes*, 7(1), 36. doi: 10.3390/fishes7010036

89. Smith NC, Wajnberg G, Chacko S, Woldemariam NT, Lacroix J, Crapoulet N, Ayre DC, Lewis SM, Rise ML, Andreassen R, Christian SL. Characterization of miRNAs in Extracellular Vesicles Released From Atlantic Salmon Monocyte-Like and Macrophage-Like Cells. *Front Immunol*. 2020 Nov 11;11:587931. doi: 10.3389/fimmu.2020.587931.

90. Han P, Qiao Y, He J, Wang X. Stress responses to warming in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) from different environmental scenarios. *Sci Total Environ*. 2023 Nov 1;897:165341. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165341.

91. He J, Chen NN, Li ZM, Wang YY, Weng SP, Guo CJ, He JG. Evidence for a Novel Antiviral Mechanism of Teleost Fish: Serum-Derived Exosomes Inhibit Virus Replication through Incorporating Mx1 Protein. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 26;22(19):10346. doi: 10.3390/ijms221910346.

92. Zhang Y, Dong F, Xing J, Tang X, Sheng X, Chi H, Zhan W. Characterization of Nervous Necrosis Virus (NNV) Nonstructural Protein B2 and Its Enhancement on Virus Proliferation. *Viruses*. 2022 Dec 17;14(12):2818. doi: 10.3390/v14122818.

- 93.** Yu Y, Liu J, Zhao Z, Lan X, Li L, Hu J, Zang Y-a, Zhang X, Chen J. Fish Snx27 promotes viral products by modulating the innate immune response and exosomal machinery. *J Virol.* 2024 Dec 17;98(12):e0097424. doi: 10.1128/jvi.00974-24.
- 94.** Zorriehzahra, M. J., Adel, M., Dadar, M., Ullah, S., Ghasemi, M. Viral nervous necrosis (VNN) an emerging disease caused by Nodaviridae in aquatic hosts: Diagnosis, control and prevention: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2019; 18(1): 30-47 doi: 10.22092/ijfs.2018.117849
- 95.** Matsukura T, Inaba C, Weygant EA, Kitamura D, Janknecht R, Matsumoto H, Hyink DP, Kashiwada S, Obara T. Extracellular vesicles from human bone marrow mesenchymal stem cells repair organ damage caused by cadmium poisoning in a medaka model. *Physiol Rep.* 2019 Jul;7(14):e14172. doi: 10.14814/phy2.14172.
- 96.** Mertes V, Bekkelund AK, Lagos L, Ciani E, Colquhoun D, Haslene-Hox H, Sletta H, Sørum H, Winther-Larsen HC. The Use of Extracellular Membrane Vesicles for Immunization against Francisellosis in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Vaccines* (Basel). 2021 Jan 9;9(1):34. doi: 10.3390/vaccines9010034.
- 97.** Vicente-Gil S, Nuñez-Ortiz N, Morel E, Serra CR, Docando F, Díaz-Rosales P and Tafalla C (2024) Immunomodulatory properties of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles on rainbow trout intestinal cells and splenic leukocytes. *Front. Immunol.* 15:1394501. doi: 10.3389/fimmu.2024.1394501