



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0118**

Exozómy z mezenchýmových kmeňových buniek ako potenciálna alternatíva bunkovej terapie v liečbe osteoartritídy

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Tímea Špaková, PhD.**

Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Lekárska fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Lekárska fakulta

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

NA

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

NA

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. ŠPAKOVÁ, Tímea; JANOČKOVÁ, Jana; ROSOCHA, Ján: Characterization and Therapeutic Use of Extracellular Vesicles Derived from Platelets. In: International journal of molecular sciences : open access journal. - ISSN 1422-0067. - Roč. 22, č. 18 (2021), art. no. 9701, s. [1-17]. - Spôsob prístupu: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/9701/htm>. - DOI 10.3390/ijms22189701

2. JANOČKOVÁ, Jana; MATEJOVÁ, Jana; MORÁVEK, Marko; HOMOL'OVÁ, Lucia; SLOVINSKÁ, Lucia; NAGYOVÁ, Alena; RAK, Dmytro; SEDLÁK, Marián; HARVANOVÁ, Denisa; ŠPAKOVÁ, Tímea; ROSOCHA, Ján : Small Extracellular Vesicles Derived from Human Chorionic MSCs as Modern Perspective towards Cell-Free Therapy. In: International journal of molecular sciences : open access journal. - ISSN 1422-0067. - Roč. 22, č. 24 (2021), art. no. 13581, s. [1-17]. - Spôsob prístupu: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85121327710&origin=resultslist>. - DOI 10.3390/ijms222413581

3. JANOČKOVÁ, Jana; MATEJOVÁ, Jana; MORÁVEK, Marko; SLOVINSKÁ, Lucia; HARVANOVÁ, Denisa; ŠPAKOVÁ, Tímea; ROSOCHA, Ján: Extracellular vesicles isolated from human plasma as potential diagnostic tool for osteoarthritis. In: Journal of extracellular vesicles. - ISSN 2001-3078. - Roč. 11, č. S1 (2022), PF02.08, s. 197-197, online. - Spôsob prístupu: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jev2.12224>. 10.1002/jev2.12224

4. Denisa HARVANOVÁ, Jana MATEJOVÁ, Lucia SLOVINSKÁ, Marek LACKO, Slavomíra GULOVÁ, Lívia KOLESÁR FECSKEOVÁ, Jana JANOČKOVÁ, Tímea ŠPAKOVÁ, Ján ROSOCHA. The Role of Synovial Membrane in the Development of a Potential In Vitro

Uplatnenie výsledkov projektu

Jedným z parciálnych cieľov projektu bola optimalizácia prípravy exozómov. Na základe posúdenia efektivity, finančnej a časovej náročnosti sme štandardizovali postup izolácie exozómov. Kondicionované médium, ktoré sme získali z MKB z choriónu sme koncentrovali a na izoláciu exozómov sme použili precipitačnú metódu. Získané exozómy sme následne prečistili ultracentrifugáciou. Nami zvolený postup na izoláciu exozómov môže slúžiť ako efektívny model pre prípravu exozómov z kondicionovaného média MKB. Pri príprave zápalového modelu OA sme vychádzali z našich predchádzajúcich výsledkov a z doteraz publikovaných prác, v ktorých používali na aktiváciu chondrocytov a synoviálnych fibroblastov syntetické zápalové cytokíny IL-1 β +TNF α . Z našich výsledkov vyplýva, že na vytvorenie zápalového mikroprostredia OA môžu byť použité nielen syntetické zápalové cytokíny IL-1 β +TNF- α ale aj kondicionované média z OA tkanív (synoviálna, membrána, infrapatelárne tukové teliesko), ktoré pôsobia ako mediátory komunikácie medzi rôznymi kĺbovými bunkami a tkanivami. Nami vytvorený 2D OA in vitro model napodobňuje in vivo bunkovú bioaktivitu a mikroprostredie chrupavky a môže slúžiť pre ďalšie analýzy bunkových interakcií a skúmanie extracelulárnych produktov. V projekte sme zisťovali aj potenciálny terapeutický účinok exozómov na liečbu OA. Zistili sme, že po pridaní exozómov do zápalového in vitro modelu OA došlo k poklesu zápalových markerov. Výsledky získané v tomto projekte ukazujú, že exozómy izolované z kondicionovaného média z MKB majú protizápalový účinok podobne ako MKB, avšak oproti MKB exozómy vďaka ich bezbunkovému statusu a malým rozmerom majú niekoľko výhod: 1) môžu sa vyhnúť filtračným orgánom v tele a majú potenciál prekročiť aj iné biologické bariéry; 2) môžu sa skladovať bez významnej straty ich aktivity; 3) majú preukázateľne nižšie riziko vzniku vedľajších reakcií a iných rizík spojených s bunkovými transformáciami a imunogenicitou; 5) môžu ovplyvniť rozdielne terapeutické mechanizmy simultánne, nakoľko je v nich obsiahnutá rôznorodá škála biomolekúl a preto majú vysoký potenciál pri liečbe rôznych zápalových ochorení. Výsledky získané z našich modelových experimentov in vitro môžu napomôcť bližšie pochopiť účinok a úlohu exozómov v liečbe defektov chrupky a podporiť efektívne využitie mediátorov MKB obsiahnutých v exozómoch na podporu regenerácie OA chrupky.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Cieľom projektu bolo sledovať terapeutický potenciál exozómov z mezenchýmových kmeňových buniek (MKB) izolovaných z choriónu a detegovať ich úlohu v interakcii s chondrocytmi v zápalovom in vitro modeli OA. MKB sme izolovali z choriónu (CHo-MKB) a kultivovali do štvrtej pasáže. Prietokovou cytometriou sme potvrdili, že CHo-MKB exprimovali povrchové markery typické pre ľudské MKB: CD90, CD105, CD73, CD29, CD44, CD54 a neexprimujú markery CD45, HLA DR a CD14. Exozómy z kondicionovaného média (CM) z CHo-MKB sme izolovali imunomagnetickou izoláciou, chromatografiou na základe veľkosti častíc molekúl, alebo precipitáciou. Na základe posúdenia efektivity izolácie (počet, veľkosť, vlastnosti exozómov), časovej a finančnej náročnosti sme na izoláciu exozómov z CM z CHo-MKB zvolili precipitačnú metódu pomocou ExoQuicku, alebo PEGu. Počet a veľkosť exozómov sme stanovili NTA analýzou. Získali sme $1.19 \pm 0,88 \times 10^9$ častíc/mL, ktorých veľkosť bola v rozmedzí od 50 do 400 nm. Prietokovou cytometriou sme potvrdili, že exozómy exprimovali exozomálne markery (CD9, CD63, CD81), markery bunkového pôvodu (CD29, CD44 a CD105) ako aj markery CD146 a MCSP (pericytový marker), zároveň boli negatívne pre ďalšie epitopy. Na analýzu miRNA profilu exozómov z CM z CHo-MKB a z tkaniva choriónu sme použili revolučnú metódu sekvenovania novej generácie (NGS). Medzi exozómami z tkaniva a MKB z choriónu sme identifikovali 80 diferenciálne exprimovaných miRNA, z toho 63 bolo upregulovaných a 17 downregulovaných. Profily MKB-miRNA sú si navzájom viac podobné, avšak TK-miRNA profily vykazujú vysokú variabilitu zrejme v závislosti od donora vzorky. Na vytvorenie zápalového in vitro modelu OA sme použili synoviálne fibroblasty (SF) a chondrocyty, ktoré sme stimulovali zápalovými cytokínmi (IL-1 β +TNF α a IFN γ) alebo CM z OA tkanív (synoviálna membrána, SM, chrupka CRT, infrapatelárne tukové teliesko, IFP) ktoré imitujú

prírodné mikroprostredie kolenného kĺbu. V CM z OA tkanív sme analyzovali prozápalové a protizápalové molekuly multiplexnou ELISA metódou. V CM-SM sme detekovali najvyššie hladiny prozápalových molekúl RANTES, IL-6, IL-8, MCP-1. Aktivácia SF s IL-1 β +TNF- α spôsobila najvýznamnejšie zmeny v produkcii IL-8, MCP 1, IL-1Ra a RANTES. Z OA tkanív malo CM-SM najvýraznejší vplyv na aktiváciu SF, čo sa prejavilo zvýšenou produkciou prozápalových molekúl (IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, VEGF). Na zistenie účinku exozómov na zápalový in vitro model OA sme použili chondrocyty, ktoré sme stimulovali pomocou CM-SM. K aktivovaným chondrocytom sme pridali exozómy získané precipitáciou z CM z CHO-MKB v množstve (1,13 x 10¹⁰/jamka). Po 24h inkubácii aktivovaných chondrocytov s exozómami došlo k poklesu génovej expresie IL-6, IL-8, COX2, MMP3, MMP13, čím sme potvrdili ich protizápalový účinok. Jedným z parciálnych cieľov projektu bola aj realizácia experimentov, ktoré nám umožnia lepšie pochopenie patogenézy OA. OA tkanivá odobraté od pacientov v neskorom štádiu OA priamo odrážajú patofyziologický stav kolenného kĺbu. Ich charakterizácia nám poskytuje informácie o biologických mechanizmoch podieľajúcich sa na patogenéze OA. Parciálne výsledky o koncentracii prozápalových a protizápalových molekúl prítomných v CM v OA tkanivách (CRT, SM) sme získali analýzou pomocou multiplexnej ELISA metódy. Komplexnejšie informácie o zápalovom profile jednotlivých OA tkanív sme získali porovnaním exozómov izolovaných z CM z týchto tkanív vs zdravé tkanivo chorionu na úrovni miRNA pomocou sekvenovania. Porovnaním normalizovanej expresie miRNA v zdravom vs OA tkanivách sme identifikovali niekoľko miRNA so štatisticky významným rozdielom v expresii, ktoré participujú na degradácii chrupky a majú svoj význam v apoptóze chondrocytov. Okrem diferenciálnej expresie, niektoré miRNA boli vo všetkých tkanivách zastúpené vo vysokom počte. Tieto miRNA so stabilnou expresiou by mohli slúžiť ako potenciálne referenčné gény v ďalších experimentoch zameraných na ich diferenciálnu expresiu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The aim of the project was to monitor the therapeutic potential of exosomes from mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the chorion and to detect their role in the interaction with chondrocytes in an inflammatory in vitro model of OA. MSCs were isolated from the chorion (CHo-MSCs) and cultured until the fourth passage. We confirmed by flow cytometry that CHo-MSCs expressed surface markers typical for human MKB: CD90, CD105, CD73, CD29, CD44, CD54 and did not express CD45, HLA DR and CD14 markers. We isolated exosomes from conditioned medium (CM) from CHo-MSCs by immunomagnetic isolation, chromatography based on the size of molecular particles, or precipitation. Based on the assessment of the isolation efficiency (number, size, properties of exosomes), time and financial demands, we chose the precipitation method using ExoQuick or PEG to isolate exosomes from CM from CHo-MSCs. We determined the number and size of exosomes by NTA analysis. We obtained $1.19 \pm 0.88 \times 10^9$ particles/mL, the size of which was in the range from 50 to 400 nm. We confirmed by flow cytometry that exosomes expressed exosomal markers (CD9, CD63, CD81), cell origin markers (CD29, CD44 and CD105) as well as CD146 and MCSP markers (pericyte marker), while they were negative for other epitopes. We used a revolutionary next-generation sequencing (NGS) method to analyze the miRNA profile of exosomes from CM from CHo-MSCs and from chorionic tissue. We identified 80 differentially expressed miRNAs between exosomes from the tissue and MSCs from the chorion, of which 63 were upregulated and 17 downregulated. MSCs-miRNA profiles are more similar to each other, but TK-miRNA profiles show high variability, apparently depending on the donor of the sample. To create an inflammatory in vitro model of OA, we used synovial fibroblasts (SF) and chondrocytes, which we stimulated with inflammatory cytokines (IL-1 β +TNF α and IFN γ) or CM from OA tissues (synovial membrane, SM, CRT cartilage, infrapatellar fat pad, IFP) that imitate the natural microenvironment of the knee joint. We analyzed pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules in CM from OA tissues by multiplex ELISA method. We detected the highest levels of pro-inflammatory molecules RANTES, IL-6, IL-8, MCP-1 in CM-SM. Activation of SF with IL-1 β +TNF- α caused the most significant changes in the production of IL-8, MCP 1, IL-1Ra and RANTES. Of the OA tissues, CM-SM had the most significant effect on SF activation, which was manifested by increased production of pro-inflammatory molecules (IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, VEGF). To investigate the effect of exosomes on

an inflammatory in vitro model of OA, we used chondrocytes that we stimulated with CM-SM. We added exosomes obtained by precipitation from CM from CHO-MSCs in an amount (1.13×10^{10} /well) to the activated chondrocytes. After a 24-hour incubation of activated chondrocytes with exosomes, there was a decrease in gene expression of IL-6, IL-8, COX2, MMP3, MMP13, which confirmed their anti-inflammatory effect. One of the partial goals of the project was the implementation of experiments that will allow us to better understand the pathogenesis of OA. OA tissues collected from late-stage OA patients directly reflect the pathophysiological state of the knee joint. Their characterization provides us with information about the biological mechanisms involved in the pathogenesis of OA. Partial results on the concentration of pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules present in CM in OA tissues (CRT, SM) were obtained by analysis using the multiplex ELISA method. We obtained more comprehensive information about the inflammatory profile of individual OA tissues by comparing exosomes isolated from CM from these tissues vs. healthy chorionic tissue at the miRNA level using sequencing. By comparing normalized miRNA expression in healthy vs. OA tissues, we identified several miRNAs with statistically significant differences in expression that participate in cartilage degradation and are important in chondrocyte apoptosis. In addition to differential expression, some miRNAs were represented in high numbers in all tissues. These miRNAs with stable expression could serve as potential reference genes in further experiments focusing on their differential expression.