

## *Approaches of Mesenchymal Stem Cells Derived-Extracellular Vesicles in Knee Osteoarthritis Defects*

Maryan Talebi Jouybari<sup>1,2</sup>  
Leila Taghiya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Developmental, Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

(Received December 19, 2023 ; Accepted February 20, 2024)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Degenerative joint disease, especially osteoarthritis (OA), is a global disease characterized by the destruction of articular cartilage, and subchondral bone. It is estimated that about 250 million people currently suffer from cartilage defects. So far, no definite and standard treatment method for OA has been reported. Recently, cell-based therapeutic techniques have been considered one of the best therapeutic strategies for the long-term treatment of articular cartilage diseases. However, many challenges include the large scale of cells required, thus the cell-free approaches are novel tools for cartilage defect treatment. For instance, extracellular vesicles (EVs) secreted by various cells such as MSCs are in charge of the therapeutic effects of stem cells. Therefore, recently EVs have advanced as powerful cell-free transfer tools, due to their high physicochemical strength and biocompatibility.

**Materials and methods:** This study is a review study that summarizes the preclinical and clinical studies that used EV-derived from different cell sources and investigates their effectiveness in treating cartilaginous tissue lesions. Current studies used small or large animal models with experimental critical size defects in knee articular cartilage to examine the effectiveness of EVs derived from MSCs. The EVs were isolated from cell sources such as adipose-derived MSCs, Bone marrow-derived MSCs, or transgenic cells. In addition, EV isolation techniques as a main challenge in studies using EVs to treat OA, specifically described in the current study. We also showed EVs isolated from each cell have unique features such as anti-inflammatory, differentiation, and therapeutic properties. We explain recent studies that use EVs as a drug carrier such as small molecules, and microRNA bioactive factors. In addition, the isolation techniques of EVs and their characterization are other challenges that we explain.

**Results:** Recent studies have shown that EVs isolated from different sources inhibit the progression of OA. Also, the results of some studies indicate the ability of EVs to repair injured cartilage. Many studies showed that in critical size defects of cartilage, the use of EVs needs scaffolds. Several studies have investigated the challenges of EV release and the required EV dose based on the size of the lesion. EVs are rapidly emerging as novel therapeutic approaches for treating cartilage lesions and OA. Despite many advances in cell therapy and promising results reported in numerous disease models, the use of cells especially genetically modified cells has limitations in regenerative medicine. It is worth noting that the use of EVs derived from stem cells or transgenic cells has no harm to the human body. As a result, therapeutic EVs have been introduced as a new therapeutic approach that does not have the same potential risks as cells.

**Conclusion:** Despite the positive results of EV in the treatment of cartilaginous lesions, it appears that the EV therapeutic barrier requires further testing in larger animal models before clinical trials. For instance, the regeneration of critical-size lesions requires the use of EVs incorporated by suitable scaffolds under dynamic conditions. Therefore, the fundamental questions to be considered are: How to use EVs as a nanoparticle instead of stem cells in combination with tissue engineering methods? What are the biological properties of EVs? What doses of EVs have the mechanistic potential for the treatment of different sizes of cartilage lesions and how EVs are stable in lesions? What is the role of EVs in the homeostasis and pathogenesis of junctions?

**Keywords:** Osteoarthritis, Extracellular Vesicles (EVs), Mesenchymal Stem Cells (MSCs), Regeneration

**J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (230): 160-178 (Persian).**

**Corresponding Author: Leila Taghiyar** - Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran. (E-mail: leilataghiyar@royaninstitute.org)

# کاربردهای وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در ترمیم ضایعات استئوآرتریت زانو

مریم طالبی جویباری<sup>۱</sup>  
لیلا تقی یار<sup>۱</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری دژنراتیو مفصل، به‌ویژه استئوآرتریت (OA)، یک بیماری جهانی است که با تخریب غضروف مفصلی و استخوان‌زیری مشخص می‌شود. براساس آمار حدود ۲۵۰ میلیون نفر در جهان از نقص غضروف رنج می‌برند. تاکنون هیچ روش درمانی قطعی برای OA گزارش نشده است. سلول درمانی یکی از استراتژی‌های مناسب درمان ضایعات غضروفی است. با این حال، چالش‌های فعلی مانند نیاز به مقیاس زیاد سلول وجود دارد. به تازگی، رویکردهای بدون سلول ابزار جدیدتری برای درمان نقص غضروف هستند. به‌عنوان مثال، وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) ترشح شده توسط سلول‌های مختلف، مسئول اثرات درمانی آن‌ها هستند. این EV به‌عنوان واسطه‌های درمانی مناسب، ابزار انتقال دارو یا نشانگرهای زیستی بیماری شناخته می‌شوند. بنابراین، به تازگی EVs به دلیل استحکام فیزیوشیمیایی و زیست سازگاری بالا به‌عنوان ابزارهای قدرتمند درمان بدون سلول شناخته شده‌اند.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع مروری است که خلاصه‌ای از مطالعات پیش بالینی و بالینی که از EV مشتق شده از منابع سلولی مختلف استفاده کرده‌اند، ارائه می‌دهد. در این مطالعات از حیوانات کوچک و بزرگ آزمایشگاهی با ایجاد ضایعه غضروفی تجربی در زانو استفاده شده است و اثربخشی EV در درمان این ضایعات را بررسی کردند. علاوه بر این در مطالعه حاضر، تکنیک‌های جداسازی EV که از چالش‌های کاربرد EV است، به‌طور خاص بررسی و معایب و مزایای آن‌ها بررسی شده است. هم‌چنین در این مطالعه نشان داده شد که EV جدا شده از هر سلول دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند خواص ضد التهابی، تمایز و درمانی است. مطالعات اخیر پیش بالینی را که از EVs به‌عنوان یک حامل داروهای مانند کوچک مولکول‌ها، microRNA ها و یا ریزفاکتورهای فعال زیستی استفاده کرده‌اند نیز در این مطالعه بررسی و نتایج آن‌ها به‌طور خلاصه ارائه شد. علاوه بر این، تکنیک‌های جداسازی EV و مشخصه‌یابی آن‌ها که از دیگر چالش‌های کاربرد EV است توضیح داده شد و چالش‌ها مورد بحث قرار گرفت.

**یافته‌ها:** EVs به‌سرعت به‌عنوان رویکردهای درمانی جدید برای درمان ضایعات غضروفی و OA در حال پیشرفت هستند. با وجود تلاش‌های فراوان در سلول درمانی و نتایج امیدوارکننده گزارش شده در مدل‌های متعدد بیماری، استفاده از سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های اصلاح شده ژنتیکی محدودیت‌هایی در پزشکی احیاکننده دارد. شایان ذکر است که استفاده از EV مشتق شده از MSCs یا سلول‌های تراریخته هیچ آسیبی برای بدن انسان ندارد. در نتیجه، EV درمانی به‌عنوان یک رویکرد درمانی جدید معرفی شده است که خطرات احتمالی مشابهی با سلول درمانی ندارد. مطالعات بررسی شده نشان داد که EV جدا شده از منابع مختلف در بسیاری موارد از پیشرفت OA جلوگیری می‌کنند. هم‌چنین نتایج برخی دیگر از مطالعات حاکی از توانایی EVs در ترمیم غضروف آسیب دیده است. بسیاری از مطالعات نشان دادند که در ضایعات با اندازه بحرانی غضروف، استفاده از EVs نیاز به داربست دارد. چندین مطالعه نشان دادند که زمان انتشار EV و دوز مورد نیاز EV براساس اندازه ضایعه در ترمیم و بازسازی غضروف مفصلی نقش موثری دارد.

**استنتاج:** با وجود نتایج امیدوارکننده استفاده از EV در مطالعات مذکور، به نظر می‌رسد که چالش‌های EV درمانی نیاز به ارزیابی بیشتری دارد. به‌عنوان مثال، بازسازی یک ضایعه با سایز بحرانی نیاز به استفاده از داربست‌های مناسب در شرایط دینامیک برای حمل EV دارد. بنابراین، سؤالات اساسی که باید در نظر گرفته شوند عبارتند از: چگونه می‌توان از EVs به‌عنوان یک نانوذره به جای سلول‌های بنیادی در ترکیب با روش‌های مهندسی بافت استفاده کرد؟ خواص بیولوژیکی EV چیست؟ چه دوزی از EV برای اندازه‌های مختلف ضایعات غضروفی نیاز است و چگونه EVs در ضایعات پایدار هستند؟ در نهایت نقش EVs در هموستاز و پاتوژنز اتصالات چیست؟

**واژه‌های کلیدی:** استئوآرتریت، وزیکول‌های خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ترمیم

E-mail: leilataghiyar@royaninstitute.org

**مؤلف مسئول:** لیلا تقی یار - تهران: پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی

۱. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری تکوینی، گروه بیولوژی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۰/۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۱

## مقدمه

بافت غضروف مفصلی توانایی ترمیم طبیعی پس از آسیب کمی دارد. بنابراین با ایجاد و پیشرفت آسیب استخوان زیر غضروفي، بیماری استئوآرتریت (OA) ایجاد می‌شود (۱).

بر اساس آمار در حال حاضر حدود ۲۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از آسیب غضروفي رنج می‌برند (۲). تا کنون هیچ درمان دارویی موثر برای ترمیم و بازسازی غضروف مفصلی آسیب دیده معرفی نشده است. داروهای سستی نیز فقط درد و التهاب را کاهش داده و هیچ ظرفیتی برای بازسازی غضروف آسیب دیده نشان نمی‌دهند (۳). رویکردهای درمانی مبتنی بر جراحی موجود مانند میکروف کچر یا پیوند بافت استئو کندرال در اکثر موارد منجر به تشکیل بافت غضروف فیبرو می‌شود (۴). رویکردهای درمانی مبتنی بر سلول مانند سلول‌های کندروسیت و یا سلول‌های بنیادی مانند MSCs، استراتژی‌های قدرتمندی برای بازسازی مجدد بافت غضروفي هستند. بررسی طولانی مدت کارآزمایی‌های بالینی درمان OA با پیوند کندروسیت‌های اتولوگ (Autologous Chondrocyte Implantation: ACI)،

در بیش از ۸۰ درصد بیماران، تا ۵ سال پس از پیوند، عملکرد خوبی را نشان داده است (۵). با وجود نتایج قابل قبول، چالش‌های زیادی در استفاده از سلول‌های اتولوگ از جمله کندروسیت‌ها وجود دارد که می‌توان به محدودیت در میزان بافت غضروف پیوندی، از دست دادن فنوتیپ کندروسیت‌ها پس از کشت در آزمایشگاه ex vivo و هزینه بالا اشاره کرد (۶). استفاده از MSCs نیز نتایج مطلوبی در ترمیم بافت غضروفي نشان داده است اما احتمال تومورزایی و نیاز به تعداد زیاد سلول‌ها و هزینه‌های بالا محدودیت‌های استفاده از این دسته از سلول‌هاست. به تازگی مشخص شده است که اثرات درمانی و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی MSCs مربوط به ترشحات خارج سلولی آن‌هاست. سه نوع اصلی EVs ترشح شده توسط سلول‌ها شامل اجسام آپوپتوز،

میکرووزیکول‌ها (MVs) و Exos شناسایی شده است. جمعیت EVs براساس اندازه یا چگالی به‌عنوان ویژگی‌های بیوفیزیکی اصلی آن‌ها به زیرگروه‌های EVs نام برده تقسیم‌بندی شده است (۷). شواهد اخیر تأیید می‌کند MSCs، زیرجمعیت‌های EVs با اندازه متفاوت را ترشح می‌کنند که در مجموعه خصوصیات بیوفیزیکی، پروتئومی، DNA، miRNA و RNA متفاوت هستند (۹،۸). از چالش‌های موجود در جداسازی EVs نبود روش‌های جداسازی استاندارد است. با این حال، انتظار می‌رود که نگرانی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی آزمایش‌های بالینی مبتنی بر آگزوزوم در مقایسه با سلول‌های زنده چون MSCs کم‌تر باشد. هدف از مطالعه حاضر، خلاصه کردن مطالعاتی است که در آن از EVs، EVs اصلاح‌شده یا EXOs مشتق‌شده از سلول‌های دستکاری ژنتیکی شده به‌عنوان یک نانوحامل طبیعی در درمان ضایعات غضروفي یا OA استفاده شده است و هم‌چنین در این مطالعه روش‌های مختلف جداسازی EVs بررسی شده است.

## ساختار غضروف مفصلی، آسیب‌ها و ترمیم

## ۱. ساختار و عملکرد غضروف مفصلی

غضروف مفصلی (Articular Cartilage) بافت همبند بسیار تخصصی بدون عروق، لنف و تراکم کم سلولی با ضخامت بین ۱ تا ۷ میلی‌متر است که نقش حمایت از بافت‌های نرم اطراف، جذب ضربه، روان‌سازی سطوح مفاصل و تسهیل حرکات استخوانی، تحمل بار مکانیکی و محافظت از استخوان‌های زیری در برابر نیروهای برشی اصطکاکی را دارد (۱۰). عملکرد حیاتی آن به ترکیب ماده زمینه خارج سلولی (ECM)، رشته‌های کلاژن، ماکرومولکول‌های ECM مانند گلیکوز آمینو گلیکان (GAGs) و گلیکوپروتئین‌ها بستگی دارد (۱۱). کندروسیت‌ها تنها سلول‌های تخصصی غضروف (۱ تا ۵ درصد حجم غضروف مفصلی) را تشکیل داده و هیچ‌گونه برهم‌کنش سلولی ندارند (۹، ۱۲، ۱۳).

## ۲. آسیب‌های غضروف مفصلی و ترمیم

ترمیم ساختاری و عملکردی ضایعات غضروف یک چالش در پزشکی بازساختی است. این آسیب‌ها به دلایل مختلفی ایجاد و علائمی مانند تورم، درد در مفصل و قفل شدن دارند (۱۶-۱۴). در ضایعه استئوکندرال، آسیب‌ها به استخوان زیر غضروفی گسترش یافته و باعث خونریزی، تشکیل لخته فیبرین و پاسخ التهابی فعال در محل آسیب می‌شود (۱۷). عدم درمان اولیه و تخریب پیشرونده غضروف منجر به استئوآرتریت می‌شود. استراتژی‌های ترمیم ضایعات غضروفی به دو رویکرد کاملاً متفاوت از جمله جراحی سنتی و روش‌های جدید مبتنی بر مهندسی بافت / سلول درمانی دسته‌بندی می‌شوند.

## ۳. درمان سنتی ضایعات غضروف

۱- میکروفرکچر : Steadman در سال ۱۹۸۴ تکنیک میکروفرکچر را برای ترمیم غضروف هیالین معرفی کرد. این روش شامل برداشتن غضروف‌های کلسیفیه و تخریب شده و ایجاد شکستگی‌های ریزی در استخوان زیری است تا لخته‌های مغز استخوان در محل ضایعه غضروف وارد و به دنبال آن بافت هیالین مانند ایجاد شود (۱۸). در بیش از ۸۰ درصد بیماران بهبودی اولیه قابل توجه ایجاد شد، اما پیگیری طولانی مدت جایگزینی بافت غضروف فیبرو را در محل ترمیم نشان داد (۱۹).

۲- آرتروسکوپی و دریلینگ استئوکندرال: برداشت قسمت‌های آسیب دیده (Debridement of joints) به روش آرتروسکوپی برای اولین بار توسط Pridi در سال ۱۹۵۹ در مدل آزمایشی خرگوش انجام شد (۲۰). در این روش، سوراخ‌های کوچکی در استخوان ساب کندرال به دنبال برداشتن غضروف ناپایدار ایجاد می‌شود و با آزادسازی پروتئوگلیکان‌های سطحی ترمیم تحریک می‌شود.

۳- موزاییک پلاستی: موزاییک پلاستی (Mosaicplasty) پیوند اتوگرافت استئوکندرال است

که اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط Matsusue مطرح شد (۲۱). در این روش پلاک‌های استوانه‌ای استئوکندرال از نواحی که زون کم‌تری را کم تحمل می‌کند به محل ضایعه غضروف پیوند می‌شوند. با وجود نتایج مناسب، بافت اهداکننده ناکافی مشکل اصلی پیوندهای استئوکندرال اتولوگ است (۲۴-۲۲).

۴- پیوند بافت نرم: پیوند پریکندریوم و یا پریستوم اتولوگ به‌عنوان یک غشای زیستی یکی دیگر از روش‌های بازسازی کننده برای ترمیم ضایعات غضروفی است که توسط Homminga در سال ۱۹۹۰ ابداع شد (۲۵-۲۷). بر این اساس، پیوند فلپ‌های پریوستوم و پریکندریوم به ضخامت ضایعات کامل غضروف مفصلی به‌طور گسترده در مدل‌های حیوانی و آزمایش‌های بالینی انسانی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۸، ۲۹).

۵- استئوتومی: استئوتومی یک جراحی اصلاحی است که امکان تنظیم مجدد استخوان را فراهم می‌کند و برای اصلاح بدشکلی‌های اولیه زانو و درمان استئوآرتریت زانو استفاده می‌شود. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط Smith استفاده شد (۳۰). با تنظیم مجدد استخوان بار روی مفصل را توزیع می‌کند و از فشار بر سطح غضروف جلوگیری می‌کند (۳۱، ۳۲).

## ۴. مهندسی بافت و روش‌های مبتنی بر سلول

۱- بافت غضروف مهندسی شده: در چند سال اخیر، مهندسی بافت به عنوان جایگزین روش‌های سنتی درمان توسعه یافته است. مهندسی بافت از سه فاکتور اصلی تشکیل شده است، (۱) داربست‌های حمایتی که از سلول‌ها و تولید ماده زمینه حمایت می‌کند (۳۳). داربست‌ها یک ماده ساختاری با منشاء مختلف (مصنوعی یا طبیعی) و سه‌بعدی با بیش‌ترین شباهت در ساختار و عملکرد محیط طبیعی سلول‌ها است. آن‌ها قابلیت نفوذ و اتصال موفقیت‌آمیز با مولکول‌های فعال زیستی مناسب را نیز فراهم کرده تا تمایز و بلوغ سلولی را تقویت کنند. یک داربست ایده‌آل برای غضروف

باید قادر به القای غضروف زایی و تشکیل ECM، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و قابل جذب، غیر ایمنی‌زا و با قدرت مکانیکی مناسب و قابل مقایسه با غضروف بومی باشد (۳۳). به تازگی، داربست‌های پرینت زیستی سه‌بعدی، ساخت سازه‌های سفارشی شده را برای محل ضایعه فردی امکان‌پذیر می‌سازد (۳۴). (۲) منبع سلولی، امروزه منابع سلولی اتولوگ مانند کندروسیت‌ها و MSCs به‌عنوان یک منبع سلولی آلونژنیک شناخته شده‌ترین منابع سلولی هستند (۳۵). (۳) ریز مواد حیاتی که برای تحریک تمایز سلولی و ترشح ECM استفاده می‌شوند. در زیر به چالش‌های منبع سلولی مهندسی بافت غضروف می‌پردازیم.

۲- درمان‌های مبتنی بر سلول در بازسازی غضروف: روش پیوند کندروسیت‌های اتولوگ (ACI) یک فناوری نوظهور بدون رد ایمنی ذاتی برای بازسازی غضروف مفصلی است که اولین بار توسط Peterson در سال ۱۹۸۷ اختراع شد (۳۶). در این روش کشت و تکثیر کندروسیت اتولوگ با نوعی روش مهندسی بافت همراه است. در این روش بیوپسی غضروف از ناحیه‌ای که وزن کم‌تری را تحمل می‌کند، تحت عمل جراحی جمع‌آوری شده، کندوسیت‌ها پس از هضم آنزیمی از ECM آزاد شده و در شرایط آزمایشگاهی در تعداد زیاد تکثیر می‌شود و سپس به ضایعه غضروفی پیوند می‌شود (۳۷-۳۹). سپس محل پیوند توسط یک غشاء پریوست پوشانده می‌شود. نتایج بالینی حاکی از آن است که ACI یک درمان موثر برای نقایص غضروف بزرگ (< ۴ سانتی متر مربع) است (۴۰). پیگیری‌های طولانی، بهبود کلی عملکرد زانو را در ۸۴ درصد بیماران نشان داده است (۴۱). پیوند کندروسیت اتولوگ همراه ماده زمینه کلاژنی به نام MACI یک نسخه جدیدتر از ACI است که در آن سلول‌های کندروسیت اتولوگ جدا شده بر روی غشاهای کلاژن نوع I یا III کشت می‌شوند (۴۲). علی‌رغم نتایج امیدوارکننده، روش ACI و MACI دارای محدودیت‌های شدید از جمله محدودیت

بافت برای جداسازی کندروسیت‌ها، آسیب اهداکننده و هیپر تروفی کندروسیت‌ها در مرحله کشت آزمایشگاهی است (۴۳). به تازگی نمونه‌های تجاری مختلف مبتنی بر کندروسیت در شرایط تولید استاندارد کشت (GMP) در بازار وجود دارد که در فازهای مختلف کارآزمایی‌های بالینی هستند (۴۴-۴۶). با توجه به محدودیت‌های کندروسیت‌ها، MSCs به‌عنوان یک منبع سلولی آلونژنیک جایگزین، برای ترمیم غضروف در نظر گرفته شده که محدودیت‌های استفاده از کندروسیت‌ها را ندارند. MSCs سلول‌های استرومایی چندتوانی هستند که در بافت‌ها و اندام‌های مختلف مانند مغز استخوان، خون بندناف، بافت چربی و مایع سینوویال وجود دارند. یکی از مزیت‌های MSCs نسبت به کندروسیت‌های تمایز یافته تکثیر آسان‌تر آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است (۴۷-۵۰). در حال حاضر، بازسازی غضروف مفصلی با استفاده از پیوند اتولوگ MSCs به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۹، ۵۱، ۵۲). تزریق داخل مفصلی MSCs یک روش کم‌تهاجم در بازسازی غضروف مفصلی به‌دلیل وجود مایع سینوویال است (۵۳).

در مطالعه‌ای MSCs نشاندار ۱ روز پس از تزریق به زانو مفصلی در اندام‌هایی مثل ریه موش مشاهده شدند اما هیچ شواهد دیگری از حضور این سلول‌ها در اندام‌های دیگر ۶ ماه پس از تزریق گزارش نشد (۳۵). در مطالعات کارآزمایی بالینی فاز I-III، سلول‌های MSCs جدا شده از بافت‌های مغز استخوان، بافت چربی، سینوویال در بررسی‌های ۱ تا ۳ ساله، ترمیم قابل قبول غضروف را نشان داده است (۶۰-۵۴). استراتژی‌های دیگری چون استفاده از سلول‌های iPSCs نیز گزارش شده است. با وجود نتایج امیدوارکننده محدودیت‌هایی چون قیمت بالا و مسائل ایمنی، به‌دست آوردن جمعیت خالص و همگن از سلول‌ها و خطر تومورزایی وجود دارد (۶۳-۶۱). در مطالعه‌ای ایجاد تومور تراوم نابالغ در موش ۱۶ هفته پس از تزریق سلول‌های iPSCs گزارش

شد. امروزه محصولات تجاری MSCs در بازار وارد شده است. Stempeucel<sup>®</sup> یک محصول بیولوژیکی مبتنی بر MSCs مشتق از مغز استخوان انسان برای درمان OA است. در یک مطالعه بالینی، تزریق داخل مفصلی Stempeucel<sup>®</sup> در بیماران مبتلا به استئوآرتریت زانو بی‌خطری و اثربخشی ترمیم غضروف و تسکین درد را نشان داد (۶۸).

Re-join یک محصول تجاری حاصل از MSCs بافت چربی اتولوگ است که در کارآزمایی بالینی فاز II در ۲۶ بیمار پیوند شد و بهبودی قابل توجهی پس از ۱۲ ماه گزارش شده است (۶۴). اگرچه، تزریق MSCs به دلیل اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، پتانسیل غضروف‌زایی و خواص پاراکرینی، نتایج قابل قبولی دارد اما خطر تومورزایی و رد MSCs هنوز حل نشده است. بنابراین امروزه استفاده از مشتقات سلولی چون وزیکول‌های ترشحی (EVs) بسیار مورد توجه است (۶۶). در بخش بعدی، شرح مفصلی از نقش آگزوزوم‌ها در ترمیم غضروف نشان داده شده است.

#### EVs جایگزین امیدوارکننده برای سلول درمانی

اثرات درمانی MSCs به ترشح عوامل پاراکرین فاکتورهای تغذیه‌ای مانند EVs نسبت داده شده است. بنابراین، بازسازی بافت با واسطه EVs یک رویکرد درمانی جدید بدون عوارض MSCs است (۶۸،۶۷). مطالعات نشان می‌دهد EVs مهم‌ترین واسطه تبادل اطلاعات سلولی در ترشحات MSCs است (۶۹). با وجود اثرات درمانی MSCs-EV در تسهیل ترمیم بافت در بیماری‌های کبدی (۷۰)، سرطان (۷۱)، انفارکتوس میوکارد (۷۲،۷۳)، آلزایمر (۷۴)، مکانیسم اثر EVs بر بازسازی غضروف بررسی نشده است.

EVs نانوذراتی به اندازه حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند که با غشای دولا به محصور شده‌اند که از طریق انواع مختلف سلول ترشح می‌شوند و هم‌چنین در تمام مایعات بدن وجود دارند. این حامل‌های سلولی حاوی

محموله‌های فعال شامل پروتئین‌ها، mRNA و طیف وسیعی از miRNAها و متابولیت‌ها است که می‌تواند پاسخ التهابی، رگ‌زایی و تعدیل ایمنی و تعدیل تومور را از طریق همجوشی و پس از عبور از موانع بیولوژیکی و تبادل اطلاعات ژنتیکی و برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های گیرنده تنظیم کنند (۷۵). تاکنون انواع مختلفی از EVs در سلول‌ها یافت شدند، از جمله میکروبادی (VBS)، آگزوزوم‌ها (Exos) و اجسام آپوپتوز که بر اساس مورفولوژی، اندازه، بیوزن، مسیرهای انتشار بالقوه و محتوای آن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. انواع سلول‌ها مانند ماکروفاژها، ماست سل‌ها، لنفوسیت‌های B و T و سلول‌های دندریتیک و هم‌چنین انواع سلول‌های بنیادی (بالغ، جنین و خون بندناف) و سلول‌های کندروسیت قادر به ترشح EVs هستند. برخلاف سلول‌ها، EVs باعث رد ایمنی حاد نمی‌شود و می‌توان آن‌ها را در مقیاس بزرگ تولید کرد و تا زمان استفاده ذخیره کرد (۷۶). با این حال، توزیع زیستی و تکنیک‌های ردیابی *in vivo* باید برای افزایش اثربخشی درمانی و اجتناب از اثرات احتمالی خارج از هدف EVs مورد بررسی قرار گیرد (۷۷). اثر درمانی مختلف EVs مشتق شده از منابع سلولی مختلف به شدت با منشأ سلول‌های والدین مرتبط است. علاوه بر این، EVs مشتق از سلول‌های کشت شده، از نظر عملکرد به دلیل سیگنال‌های دریافتی از ریزمحیط اطراف، با EVs مشتق از بدن متفاوت است (۷۸). با وجود پیشرفت‌های زیاد در سلول درمانی تراریخته و نتایج امیدوارکننده که در مدل بیماری ژنتیکی گزارش شده است استفاده از سلول‌های اصلاح‌شده ژنتیکی به دلیل ناقل و ویروسی، محدودیت‌هایی در پزشکی بازساختی دارد، در نتیجه EVs خطرات بالقوه مشابه سلول‌های دستکاری شده را ندارد.

مطالعات نشان داده است که محیط کشت MSCs اثرات مثبتی بر بیماری‌های مختلف مانند انفارکتوس میوکارد، بیماری کلیوی و تخریب کامل کبدی دارد (۸۱،۷۹). پس از آن، برای اولین بار، EVs حاصل از

سلول‌های پیش‌ساز قلبی (CPCs) پتانسیل بازسازی قلب را به خوبی نشان داد (۸۲). علاوه بر این، EVs پتانسیل درمانی برای ترمیم دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای را نیز نشان داد (۸۳). بنابراین، EVs مشتق از MSCs و سلول‌های هسته پالپوسوس (NPCs) مورد ارزیابی قرار گرفتند. MSCs-EV تکثیر NPCها را زیاد کرد و تولید ماده زمینه خارج سلولی را در NPCs در حال انحطاط بهبود بخشید (۸۴). هم‌چنین، اثر مشابه MSCs مشتق از چربی (Adipose derived MSCs: ADSC) و پروتئین‌های محلول، بازسازی عضلات اسکلتی را تحریک می‌کند (۸۵، ۸۶). EVs هم‌چنین با موفقیت برای اختلالات عصبی مانند مولتیپل اسکلروزیس (MS)، بیماری آلزایمر (AD) (۸۷)، بیماری پارکینسون (PD) (۸۸)، اسکروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) (۸۹)، مولتیپل اسکلروزیس (MS) (۹۰)، سکتة مغزی و آسیب عصبی (۹۱) و آسیب‌های حاد و مزمن کلیوی و تنگی حالب استفاده شده است (۹۲).

در مطالعه پیش‌بالینی موش‌های مبتلا به نارسایی حاد کبدی، EVs آزاد شده از hASCs میزان بقا را در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد (۹۳). با وجود توانایی‌های درمانی EVs، هنوز بسیاری از مسائل حل نشده باقی مانده‌اند، مانند جداسازی استاندارد، آلوده شدن EVs با آگزوزوم درون‌زای سرم گاوی محیط کشت که این مسائل نیازمند پردازش در مقیاس بزرگ است. به تازگی روش کشت بیوراکتور جایگزین مناسبی برای تولید EVs در فرآیند بالینی در مقیاس بزرگ است. نتایج نشان داده که ۴۰ برابر EVs بیشتر در هر میلی‌لیتر محیط کشت سلولی بیوراکتور در مقایسه با فلاسک کشت به دست می‌آید (۹۴). تحقیقات کنونی پروتکل‌های متعددی را برای جداسازی EVs ارائه می‌دهد که در این مطالعه روش‌های فعلی جداسازی و خصوصیات EVs توضیح داده می‌شود.

#### ۱. جداسازی و بررسی خصوصیات EVs

روش‌های متفاوت جداسازی EVs از محیط

کشت رویی (Condition media) سلول‌های کشت شده و مایعات بیولوژیکی بدن مانند خون و پلاسما گزارش شده است (۹۵). خواص عملکردی، توزیع زیستی و یکپارچگی غشاء آگزوزوم به‌طور عمده در رویکردهای جداسازی دخیل است. هم‌چنین نشان‌گرهای زیستی آگزوزومی به عنوان عامل تشخیصی و پیش‌آگهی برای بسیاری از سرطان‌ها استفاده می‌شود، اما EVs اغلب توسط سایر وزیکول‌های غشایی و لیپوپروتئین‌های جدا شده آلوده می‌شوند. بنابراین، جمع‌آوری محیط باید به دقت بررسی شود تا اطمینان حاصل شود EVs جدا شده خالص است. به عنوان مثال، محیط کشت غنی شده با سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) حاوی EVs فراوان است، برای غلبه بر این مشکل، باید از مواد مکمل دیگری مانند آلبومین سرم گاوی (BSA) به جای FBS استفاده و قبل از جمع‌آوری EVs، باید شستشوی کافی و حذف EVs غیراختصاصی انجام شود (۹۶).

تکنیک‌های جداسازی فعلی براساس تفاوت اندازه EVs یا نشانگرهای اختصاص سطحی آن انجام می‌شود. چندین روش مانند اولتراسانتریفیوژ، سانتریفیوژ با گرادیان چگالی، اولترافیلتراسیون، رسوب پلی اتیلن گلیکول (PEG)، ایزوله سازی و کروماتوگرافی برای جداسازی EVs استفاده شده است (۹۷) که در زیر به تفصیل توضیح داده می‌شود.

اولتراسانتریفیوژ رایج‌ترین روش برای جداسازی و پالایش EVs است که با سرعت‌های مختلف انجام می‌شود. سانتریفیوژ با نیروی g کم (به‌عنوان مثال ۵۰۰ g برای ۵-۱۰ دقیقه) برای جداسازی بقایای سلولی و سپس با نیروی g زیاد (به‌عنوان مثال ۱۰۰۰۰۰ g برای ۱-۲ ساعت) برای جداسازی EVs انجام می‌شود. روش اولتراسانتریفیوژ به عوامل متعددی مانند نیروی g، نوع روتور، ضریب K و اسکوزیته محلول، برای بستگی دارد. یکی از روش‌های رایج جداسازی EVs براساس اندازه، اولترافیلتراسیون است. بسته به اندازه ذرات و وزن‌های مولکولی مختلف، یک غشای نیمه تراوا برای



کاربردهای خاص EVs به عنوان سیستم دارو یا دارورسانی در غضروف مفصلی، OA و RA (روماتوئید آرتریت) در محیط بالینی تمرکز خواهیم کرد.

## ۲. کاربردهای پیش بالینی و بالینی آگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی در تقایص غضروف

مطالعات حاضر مربوط به ترمیم غضروف و/یا استئوآرتریت با استفاده از EVs به مدل های حیوانی تجربی است. نتایج نشان می دهد که EVs باعث کاهش التهاب و افزایش تشکیل غضروف شبه هیالین در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی می شوند. به عنوان مثال، S.Zhang و همکاران تأثیر تزریق داخل مفصلی EVs مشتق از MSCs جنین انسان را در درمان ضایعه استئوآرترال تجربی در مدل موش بررسی کردند. نتایج هیستوپاتولوژی نشان دهنده ترمیم کامل غضروف و استخوان زیر غضروفی در گروه تیمار پس از ۱۲ هفته در مقایسه با گروه کنترل (PBS) بود (۱۰۳،۶۶). هم چنین S.Cosenza و همکاران نشان دادند که میکروذرات (MPs) عملکرد غضروف زایی و ضدالتهابی مشابه Exos داشته و از موش ها در برابر ابتلا به OA محافظت می کنند (۱۰۴). Vonk و همکاران همچنین نشان داده اند که MSCs-EV می تواند غضروف آرتروزی را با کاهش پاسخ های التهابی و تحریک سلول های غضروفی به ترشح ماده زمینه خارج سلولی، ترمیم کنند (۱۰۵). اگرچه، نتایج امیدوارکننده ای در حیوانات کوچک گزارش شده است، اما مطالعات کمی اثر EVs را در حیوانات بزرگ و یا انسان بررسی کرده است (۱۰۶). مطالعات نشان داده است MSCs جدا شده از مایع سینوویال پتانسیل ترمیم غضروف را دارد، اما استفاده از این سلول ها با محدودیت هایی مانند ایمنی زایی مرتبط است. در این رابطه، تائو و همکاران اثر درمانی دو نوع EVs آزاد شده از MSCs مشتق از سینوویال (SMSC-EV) و MSCs مشتق از سینوویال ترانسژن را با بیان بیش از حد miR-140-5p در مدل استئوآرتریت موش مقایسه

کردند (۱۰۷). نتایج نشان داده که miR-140-5p نقش اساسی در تمایز غضروفی، هموستازی، تکثیر و مهاجرت کندروسیت ها در شرایط آزمایشگاهی دارد (۱۰۸،۱۰۷). بنابراین، EVs سلول های دستکاری ژنتیکی شده توانایی درمانی قابل توجهی را برای استفاده در محیط های بالینی نشان می دهند.

شواهد نشان داده است که آپوپتوز کندروسیت ها علت اصلی شروع و پیشرفت استئوآرتریت است. Chi و همکاران نشان داده اند که MSC-Exos می تواند آپوپتوز کندروسیت ها را مهار و زنده ماندن آن ها را در شرایط التهابی بهبود بخشد (۱۰۹). برخی از دانشمندان معتقدند EVs با تحریک واسطه های القایی بافتی، نقش مهمی در القای موضعی بازسازی بافت ایفا می کنند (۱۱۰). به عنوان مثال، حضور کندروسیت ها برای حفظ ریزساختار ماده زمینه ترشحی نیاز است (۱۱۱،۱۰۱). Chen و همکاران اثر آگزوزوم های مشتق از کندروسیت (CC-Exos) به عنوان یک محرک غضروف زایی در تشکیل غضروف نابجا را در تزریق جلدی با BMSC-Exos مقایسه کرده اند (۱۱۲). غضروف تولید شده در حضور CC-Exos با حداقل هیپرتروفی و رگ زایی همراه بود، در حالی که در حضور BMSC-Exos با هیپرتروفی همراه بود. آن ها به این نتیجه رسیدند که CC-Exos می تواند از niche غضروفی در محیط زیر جلدی تقلید کند.

مطالعات قبلی نقش مهم فاکتورهای پاراکرین MSCs را در بازسازی بافت نشان داد (۱۱۳). از این رو، Tofiño-Vian و همکاران، عملکرد EVs جدا شده از AD-MSC انسانی را بر کندروسیت های جدا شده از غضروف آرتروزی بررسی کردند. Exos باعث کاهش عوامل التهابی مانند TNF-a، IL-6، PGE2 و NO در کندروسیت آرتروزی می شوند. علاوه بر این، EVs آزادسازی فعالیت MMP و بیان MMP-13 را در کندروسیت آرتروزی کاهش دادند در حالی که سیتوکین ضدالتهابی IL-10 و بیان کلاژن II به طور قابل توجهی افزایش یافت (۱۱۴). با وجود خواص درمانی متعدد

را به محل آسیب و آزادسازی EV را به طور پایدار افزایش می‌دهد (۱۱۹).

در مطالعه دیگری، Wu و همکارانش نشان دادند MSCs-EV مشتق از چربی آپوپتوز کندروسیت‌ها را مهار و فرآیندهای آنابولیک و کاتابولیک را متعادل می‌کند. آن‌ها توصیه کردند که این مکانیسم می‌تواند با مهار مسیر mTOR-توفاژی به واسطه miR100-5p مرتبط باشد (۱۲۰). روی هم رفته، EVs را می‌توان به عنوان یک درمان جدید برای ضایعات غضروفی در نظر گرفت (جدول شماره ۱).

### بحث

به تازگی، پزشکی احیاکننده بدون سلول مبتنی بر توانایی منحصر به فرد EVs مشتق از انواع سلول‌ها یک کاندید جدید و نویدبخش برای درمان انواع بیماری‌هاست (۱۲۱). در حالی که مطالعات زیادی توانای EVs جدا شده از سلول‌های بنیادی را برای بهبود بیماری‌های مختلف نشان داده‌اند، استفاده از آن در بازسازی غضروف و پاتوژنز OA محدود است. به طور مثال مطالعات کارآزمایی بالینی ثبت شده در سایت معتبر clinical trial.gov چون کارآزمایی بالینی به شماره NCT05060107 بسیار محدود است. در نتیجه، به نظر می‌سد درمان با EV در مدل حیوانات بزرگ‌تر ضروری است (۱۲۲، ۱۲۳). در واقع، به دلیل پیچیدگی

اگزوزوم‌ها، راه‌های تجویز آن مشکل اصلی در استفاده از EVs هستند. تزریق رایج‌ترین روش برای استفاده از EVs است که به دلیل خروج سریع از محل آسیب، روش موثری برای بازسازی اختلالات غضروفی نیست. به نظر می‌رسد بارگذاری EVs در هیدروژل یک تکنیک مناسب برای تثبیت آن‌ها در محل آسیب است. در یک مطالعه کپسوله‌سازی EVs در چسب هیدروژل القا شده با نور (PIC) نشان داد این پیچ‌بافتی به خوبی با بافت غضروفی بومی ادغام شده و EVs به طور موثر در محل ضایعه حفظ و رهایش یافت (۱۱۵).

در شرایط عادی، کندروسیت‌ها تعادل پویایی از فعالیت آنابولیک و کاتابولیک دارند که وابسته به فعالیت گلیکولیز است و برای تأمین انرژی اولیه مورد نیاز است (۱۱۶). در استئوآرتریت، کندروسیت‌ها خاصیت انعطاف‌پذیری متابولیک خود را از دست می‌دهند، که منجر به کاهش بیورژن سلولی میتوکنندری و افزایش آسیب DNA میتوکنندری می‌شود (۱۱۷). در حال حاضر، شواهد نشان می‌دهد که EVs نقش مهمی در ارتباطات میتوکنندری بین سلولی دارند. محتویات EV ممکن است شامل ژنوم میتوکنندری یا حتی کل میتوکنندری باشد (۱۱۸). بنابراین، Chen و همکاران اثر EV مشتق از MSC بر هموستاز میتوکندریایی را بررسی کرد. آن‌ها یک داربست پرینت سه بعدی از GeIMA، ECM و EV ساخته و نشان دادند این ساختار مهاجرت غضروفی

**جدول شماره ۱:** جدول مطالعات پیش‌بالینی با استفاده از اگزوزوم‌های جدا شده از انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، روش جداسازی اگزوزوم و دوز تزریق شده را نشان می‌دهد

منبع	دوز	ارزایی دوز	روش جداسازی	نام محصول	مدل حیوانی
(۱۲۵)	۸ میکرولیتر	Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)	روش	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های iPSCs	استئوآرتریت القا شده با کلاژن
(۱۲۶)	۱۰۰ میکروگرم	Nanoorange Protein Quantification	کیت	اگزوزوم	کندگی غضروف مفصلی (عمق ۱ و ۱/۵ میلی متر)
(۶۶)	۱۰۰ میکروگرم	پروتئین	Molecular Weight Cut-Off (MWCO)	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های بنیادی جنینی	کندگی غضروف زانو
(۱۲۰)	۱۰ <sup>۱۰</sup> اگزوزوم در میلی لیتر	پروتئین	Tangential Flow Filtration (TFF)	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های بنیادی جنینی	استئوآرتریت القا شده در موش C57/BL6
(۱۰۷)	۱۰ <sup>۱۲</sup> اگزوزوم در میلی لیتر	کیت جداسازی پروتئین	Exoquick™(EQ) Reagent Kit(SBI) And Ultrafiltration	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های بنیادی سنوویال	استئوآرتریت القا شده در موش Dawley
(۱۰۴)	۲۵۰ نانوگرم در میلی لیتر	پروتئین	DLS	اگزوزوم	استئوآرتریت القا شده با کلاژن
(۱۲۷)	۲/۵×۱۰ <sup>۱۲</sup> در میلی لیتر	Qnano Platform (TRPS)	سانتریفیوژ	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های iPSCs	استئوآرتریت القا شده در خرگوش
(۱۰۳)	۵ میکرولیتر	پروتئین	اولتراسانتریفیوژ	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های بنیادی جنینی	استئوآرتریت القا شده در موش C57/BL6
(۱۱۲)	۶ میکرولیتر	پروتئین	اولتراسانتریفیوژ	اگزوزوم جدا شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان	پیوند زیربستی
(۱۲۸)	۲۵۰ نانوگرم	پروتئین	سانتریفیوژ	اگزوزوم	استئوآرتریت القا شده با کلاژن
(۱۱۹)	۵۰ میکروگرم	پروتئین	کیت Exoquick-TC	Mir-105-5p Exosomes	استئوآرتریت القا شده با کلاژن

بررسی شود. در حالی که پیشرفت خارق‌العاده‌ای در درک ویژگی‌های بیولوژیکی محموله‌های EVs حاصل شده است، تحقیقات هم‌چنین باید بر چالش‌های مربوط به دستیابی تأییدیه‌های نظارتی و انتقال بالقوه آن‌ها به محیط بالینی تمرکز کند.

به طور خلاصه، مهم‌ترین چالش کاربردهای بالینی EVs، خصوصیات فارماکودینامیک و توزیع بیولوژیکی EVs تزریقی و عوارض جانبی آن‌هاست. اگرچه، چند دقیقه پس از تزریق، بازگشت EVs به برخی از اندام‌های نرم مانند ریه، کبد یا طحال گزارش شده است. اما، یک بررسی قوی از فارماکوکینتیک، متابولیسم، دوز بیولوژیکی موثر و سمیت باید برای ایمنی انجام شود. بنابراین به نظر می‌رسد تا کاربردهای بالینی راه زیادی در پیش است.

## سپاسگزاری

نویسندگان از گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان کمال تشکر را بابت اجازه استفاده از آدرس مکاتبه آن مرکز دارند.

## References

- Christensen BB. Autologous tissue transplantations for osteochondral repair. *Dan Med J* 2016; 63(4): B5236.
- Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *J Pain Res* 2018; 11: 2189-2196.
- Hou PW, Fu PK, Hsu HC, Hsieh CL. Traditional Chinese medicine in patients with osteoarthritis of the knee. *J Tradit Complement Med* 2015; 5(4): 182-196.
- Erggelet C, Vavken P. Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint-A golden standard? *J Clin Orthop Trauma* 2016; 7(3): 145-152.
- Mithoefer K, Peterson L, Saris DB, Mandelbaum BR. Evolution and Current Role of Autologous Chondrocyte Implantation for Treatment of Articular Cartilage Defects in the Football (Soccer) Player. *Cartilage* 2012; 3(1 Suppl): 31S-36S.
- Basad E, Wissing FR, Fehrenbach P, Rickert M, Steinmeyer J, Ishaque B. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015; 23(12): 3729-3735.
- Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs)

ساختار غضروف، بازسازی ضایعه ۳ سانتی متری نیاز به استفاده از EVs در ترکیب با داربست‌های مناسب در شرایط دینامیکی است (۱۲۴). بنابراین، سؤالات اساسی که باید در نظر گرفته شوند عبارتند از: چگونه از EVs به عنوان یک نانوذره به جای سلول در ترکیب با روش‌های مهندسی بافت استفاده کنیم؟ خواص بیولوژیکی انواع EVs چیست؟ چه دوزی از EVs پتانسیل موثری برای درمان اندازه‌های مختلف ضایعات غضروفی دارند و چگونه EVs در محل ضایعات پایدار شده و یا می‌توانند از میان ساختار متراکم ECM غضروف منتقل شوند. نقش EVs در هموستاز و پاتوژنز اتصالات چیست؟

دوزهای بیولوژیکی مناسب EV، اشکال ترکیب شده با مواد زیستی جدید هنوز برای تولید بافت غضروفی در مطالعات پیش‌بالینی ارزیابی نشده است. از سوی دیگر، تولید و تنظیم EVs به‌عنوان حاملی که حاوی ترکیبات مختلفی مانند miRNA، فاکتورهای رشد و پروتئین هستند، یکی از چالش‌هایی است که برای درمان انواع بیماری‌ها حل نشده است. برای استفاده بالینی EVs، باید آزمایش‌های پیش‌تری طراحی و

- Characterization. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6): 1153.
8. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 2016; 6: 22519.
  9. Yi X, Chen J, Huang D, Feng S, Yang T, Li Z, et al. Current perspectives on clinical use of exosomes as novel biomarkers for cancer diagnosis. *Front Oncol* 2022; 12: 966981.
  10. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008; 87: 77-95.
  11. Responde DJ, Natoli RM, Athanasiou KA. Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Crit Rev Biomed Eng* 2007; 35(5): 363-411.
  12. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med* 2017; 36(3): 413-425.
  13. Tatari H. The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007; 41(Suppl 2): 1-5.
  14. Zhang Y, Zhang J, Chang F, Xu W, Ding J. Repair of full-thickness articular cartilage defect using stem cell-encapsulated thermogel. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 88: 79-87.
  15. Liu Y, Shah KM, Luo J. Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9: 770655.
  16. Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7(1): 15-28.
  17. Cao H, Wang X, Chen M, Liu Y, Cui X, Liang J, et al. Childhood Cartilage ECM Enhances the Chondrogenesis of Endogenous Cells and Subchondral Bone Repair of the Unidirectional Collagen-dECM Scaffolds in Combination with Microfracture. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021; 13(48): 57043-57057.
  18. Song SJ, Park CH. Microfracture for cartilage repair in the knee: current concepts and limitations of systematic reviews. *Ann Transl Med* 2019; 7(Suppl 3): S108.
  19. Redondo ML, Beer AJ, Yanke AB. Cartilage Restoration: Microfracture and Osteochondral Autograft Transplantation. *J Knee Surg* 2018; 31(3): 231-238.
  20. Hubbard MJ. Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78(2): 217-219.
  21. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993; 9(3): 318-321.
  22. Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(Suppl 2): 25-32.
  23. Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, Vásárhelyi G, Fülecs P, Módics L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(Suppl 1): 65-72.
  24. Szerb I, Hangody L, Duska Z, Kaposi NP. Mosaicplasty: long-term follow-up. *Bull Hosp Jt Dis* 2005; 63(1-2): 54-62.
  25. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72(6): 1003-1007.

26. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, van der Linden AJ, Bulstra SK, et al. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 1997; 21(5): 313-317.
27. Bouwmeester P, Kuijer R, Terwindt-Rouwenhorst E, van der Linden T, Bulstra S. Histological and biochemical evaluation of perichondrial transplants in human articular cartilage defects. *J Orthop Res* 1999; 17(6): 843-849.
28. Janssen MPF, van der Linden EGM, Boymans TAEJ, Welting TJM, van Rhijn LW, Bulstra SK, et al. Twenty-Two-Year Outcome of Cartilage Repair Surgery by Perichondrium Transplantation. *Cartilage* 2021; 13(1\_suppl): 860S-867S.
29. Andriolo L, Boffa A, Filardo G. Comment on "Twenty-two-year outcome of cartilage repair surgery by perichondrium transplantation" Janssen MPF, et al. *Cartilage* 2020; 13(1\_suppl): 1827S-1828S.
30. Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87(4): 445-449.
31. Peng H, Ou A, Huang X, Wang C, Wang L, Yu T, et al. Osteotomy Around the Knee: The Surgical Treatment of Osteoarthritis. *Orthop Surg* 2021; 13(5): 1465-1473.
32. Murray R, Winkler PW, Shaikh HS, Musahl V. High Tibial Osteotomy for Varus Deformity of the Knee. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev* 2021; 5(7): e2100141.
33. Santhagunam A, Madeira C, Cabral JM. Genetically engineered stem cell-based strategies for articular cartilage regeneration. *Biotechnol Appl Biochem* 2012; 59(2): 121-131.
34. Daly AC, Freeman FE, Gonzalez-Fernandez T, Critchley SE, Nulty J, Kelly DJ. 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 2017; 6(22).
35. Huang K, Li Q, Li Y, Yao Z, Luo D, Rao P, et al. Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells, Stimulating Factors and Scaffolds. *Curr Stem Cell Res Ther* 2018; 13(7): 547-567.
36. Arshi A, Petrigliano FA, Williams RJ, Jones KJ. Stem Cell Treatment for Knee Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2020; 13(1): 20-27.
37. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(Suppl 2): 17-24.
38. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res* 1996(326): 270-283.
39. Baghban Eslami Nezhad M R, Taghi Yar L, Gharezi A. Study of Chondrogenic Potential of Fibroblastic Cells Isolated from NMRI mice. *Anatomical Sciences Journal* 2006; 4(2): 119-130.
40. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res* 2002; (402): 21-37.
41. Xu X, Shi D, Shen Y, Xu Z, Dai J, Chen D, et al. Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin. *Arthritis Res Ther* 2015; 17(1): 20.
42. Flanigan DC, Sherman SL, Chillelli B, Gersoff W, Jones D, Lee CA, et al. Consensus on Rehabilitation Guidelines among Orthopedic Surgeons in the United States following Use of Third-Generation Articular Cartilage

- Repair (MACI) for Treatment of Knee Cartilage Lesions. *Cartilage* 2021; 13(1\_suppl): 1782S-1790S.
43. Minas T, Ogura T, Bryant T. Autologous Chondrocyte Implantation. *JBJS Essent Surg Tech* 2016; 6(2): e24.
  44. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89(10): 2105-2112.
  45. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grøntvedt T, Solheim E, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86(3): 455-464.
  46. Benthien JP, Behrens P. The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011; 19(8): 1316-1319.
  47. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48(6): 361-370.
  48. Fekrazad R, Eslaminejad MB, Shayan AM, Kalhori KA, Abbas FM, Taghiyar L, et al. Effects of Photobiomodulation and Mesenchymal Stem Cells on Articular Cartilage Defects in a Rabbit Model. *Photomed Laser Surg* 2016; 34(11): 543-549.
  49. Pakzad M, Hassani SN, Abbasi F, Hajizadeh-Saffar E, Taghiyar L, Fallah N, et al. A Roadmap for the Production of a GMP-Compatible Cell Bank of Allogeneic Bone Marrow-Derived Clonal Mesenchymal Stromal Cells for Cell Therapy Applications. *Stem Cell Rev Rep* 2022; 18(7): 2279-2295.
  50. Taghiyar L, Eslaminejad MB. Cartilage Differentiation of mesenchymal stem cells from murine bone marrow by alginate gel in vitro. *Razi Journal* 2007; 12(1): 97-106.
  51. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(12): 2173-2185.
  52. Dehghan MM, Baghaban Eslaminejad M, Motallebizadeh N, Ashrafi Halan J, Tagiyar L, Soroori S, et al. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Platelet-Rich Plasma Accelerate Distraction Osteogenesis in A Canine Model. *Cell J* 2015; 17(2): 243-252.
  53. Nasiri N, Hosseini S, Alini M, Khademhosseini A, Baghaban Eslaminejad M. Targeted cell delivery for articular cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *Drug Discov Today* 2019; 24(11): 2212-2224.
  54. Soler R, Orozco L, Munar A, Huguet M, López R, Vives J, et al. Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee* 2016; 23(4): 647-654.
  55. Pers YM, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(7): 847-856.
  56. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of

- preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015; 23(9): 2459-2574.
57. Ozeki, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; 24(6): 1061-1070.
  58. Turajane T, Chawewannakorn U, Larbpaiboonpong V, Aojanepong J, Thitiset T, Honsawek S, et al. Combination of intra-articular autologous activated peripheral blood stem cells with growth factor addition/preservation and hyaluronic acid in conjunction with arthroscopic microdrilling mesenchymal cell stimulation Improves quality of life and regenerates articular cartilage in early osteoarthritic knee disease. *J Med Assoc Thai* 2013; 96(5): 580-588.
  59. Chiang ER, Ma HL, Wang JP, Liu CL, Chen TH, Hung SC, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in Rabbits. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149835.
  60. Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med* 2012; 15(7): 422-428.
  61. Lo Monaco M, Merckx G, Ratajczak J, Gervois P, Hilkens P, Clegg P, et al. Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures. *Stem Cells Int* 2018; 2018: 9079538.
  62. Kotaka S, Wakitani S, Shimamoto A, Kamei N, Sawa M, Adachi N, et al. Magnetic Targeted Delivery of Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Articular Cartilage Repair. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 9514719.
  63. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, et al. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res* 2015; 36(3): 179-186.
  64. Lu L, Dai C, Zhang Z, Du H, Li S, Ye P, et al. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 143.
  65. Bobick BE, Chen FH, Le AM, Tuan RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87(4): 351-371.
  66. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; 24(12): 2135-2140.
  67. Mustonen AM, Nieminen P. Extracellular Vesicles and Their Potential Significance in the Pathogenesis and Treatment of Osteoarthritis. *Pharmaceuticals* 2021; 14(4):315.
  68. Sun Y, Zhao J, Wu Q, Zhang Y, You Y, Jiang W, et al. Chondrogenic primed extracellular vesicles activate miR-455/SOX11/FOXO axis for cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *NPJ Regen Med* 2022; 7(1): 53.
  69. La Greca A, Solari C, Furmento V, Lombardi A, Biani MC, Aban C, et al. Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation. *Exp Mol Med* 2018; 50(9): 1-12.
  70. Di Rocco G, Baldari S, Toietta G. Towards Therapeutic Delivery of Extracellular

- Vesicles: Strategies for In Vivo Tracking and Biodistribution Analysis. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5029619.
71. Ren K. Exosomes in perspective: a potential surrogate for stem cell therapy. *Odontology* 2019; 107(3): 271-284.
  72. Bang OY, Kim EM. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *Front Neurol* 2019; 10: 211.
  73. Muller P, Lemcke H, David R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases-Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(6): 2607-2655.
  74. Iranifar E, Seresht BM, Momeni F, Fadaei E, Mehr MH, Ebrahimi Z, et al. Exosomes and microRNAs: New potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy. *J Cell Physiol* 2019; 234(3): 2296-2305.
  75. Nooshabadi VT, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, Allahverdi A, Izadpanah M, Daneshimehr F, et al. The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. *J Cell Biochem* 2018; 119(10): 8048-8073.
  76. Lu K, Li HY, Yang K, Wu JL, Cai XW, Zhou Y, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 108.
  77. Mitchell R, Mellows B, Sheard J, Antonioli M, Kretz O, Chambers D, et al. Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 116.
  78. Seo Y, Kim HS, Hong IS. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Immunomodulatory Therapeutics. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 5126156.
  79. Ricardo SD, Deane JA. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology* 2005; 10(3): 276-282.
  80. Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 109.
  81. Nicolas C, Wang Y, Luebke-Wheeler J, Nyberg SL. Stem Cell Therapies for Treatment of Liver Disease. *Biomedicines* 2016; 4(1): 2.
  82. Alibhai FJ, Tobin SW, Yeganeh A, Weisel RD, Li RK. Emerging roles of extracellular vesicles in cardiac repair and rejuvenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315(4): H733-H744.
  83. Wu X, Sun W. Extracellular Vesicles Derived From Stem Cells in Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 793363.
  84. Sun Y, Zhang W, Li XU. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-105-5p via small extracellular vesicles to rejuvenate senescent nucleus pulposus cells and attenuate intervertebral disc degeneration. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1):286.
  85. Watson DC, Bayik D, Srivatsan A, Bergamaschi C, Valentin A, Niu G, et al. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. *Biomaterials* 2016; 105: 195-205.

86. Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, Sere YY, Coles A, Didiot MC, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther* 2018; 26(12): 2838-2847.
87. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Minjarez B, Gutiérrez-Mercado YK, Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA. Potential Effects of MSC-Derived Exosomes in Neuroplasticity in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 317.
88. Zhang T, Ma S, Lv J, Wang X, Afewerky HK, Li H, et al. The emerging role of exosomes in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2021;68: 101321.
89. Ferrara D, Pasetto L, Bonetto V, Basso M. Role of Extracellular Vesicles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci* 2018; 12: 574.
90. Blonda M, Amoruso A, Martino T, Avolio C. New Insights Into Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2018; 9: 604.
91. Graykowski DR, Wang YZ, Upadhyay A, Savas1 JN. The Dichotomous Role of Extracellular Vesicles in the Central Nervous System. *iScience* 2020; 23(9): 101456.
92. Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, Ramírez-Bajo MJ. Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. *Nefrologia* 2017; 37(2): 126-137.
93. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol* 2015; 1295: 179-209.
94. Yan L, Wu X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity. *Cell Biol Toxicol* 2020; 36(2): 165-178.
95. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2013;7(5): 769-778.
96. Shelke GV, Lasser C, Gho YC, Lotvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 10.
97. Lim J, Choi M, Lee H, Kim YH, Han JY, Lee ES, et al. Direct isolation and characterization of circulating exosomes from biological samples using magnetic nanowires. *J Nanobiotechnology* 2019; 17(1): 1.
98. Contreras-Naranjo JC, Wu HJ, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* 2017; 17(21): 3558-3577.
99. Liu C, Su C. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics* 2019; 9(4): 1015-1028.
100. Rim KT, Kim SJ. Quantitative Analysis of Exosomes From Murine Lung Cancer Cells by Flow Cytometry. *J Cancer Prev* 2016; 21(3): 194-200.
101. Leyh M, Seitz A, Dürselen L, Springorum HR, Angele P, Ignatius A, et al. Osteoarthritic cartilage explants affect extracellular matrix production and composition in cocultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(3): 77.
102. Rana A, Zhang Y, Esfandiari L. Advancements in microfluidic technologies for isolation and early detection of circulating cancer-related biomarkers. *Analyst* 2018; 143(13): 2971-2991.

103. Wang Y, Yu D, Liu Z, Zhou F, Dai J, Wu B, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 189.
104. Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C, Noël D, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep* 2017; 7(1): 16214.
105. Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, Klumperman J, Coffe PJ, Saris DB, et al. Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro. *Theranostics* 2018; 8(4): 906-920.
106. Xin H, Y Li, Chopp M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 377.
107. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics* 2017; 7(1): 180-195.
108. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum* 2009; 60(9): 2723-2730.
109. Qi H, Liu DP, Xiao DW, Tian DC, Su YW, Jin SF, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2019; 55(3): 203-210.
110. Becerra J, Santos-Ruiz L, Andrades JA, Marí-Beffa M. The stem cell niche should be a key issue for cell therapy in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep* 2011; 7(2): 248-255.
111. Zhao X, Hwang NS, Bichara DA, Saris DB, Malda J, Vacanti JP, et al. Chondrogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells grown in chondrocyte-conditioned medium for auricular reconstruction. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(10): 2763-2773.
112. Chen Y, Xue K, Zhang X, Zheng Z, Liu K. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 318.
113. Ratajczak MZ, Jadczyk T, Pędziwiatr D, Wojakowski W. New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine. *Pol Arch Med Wewn* 2014; 124(7-8): 417-426.
114. Tofino-Vian M, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, Silvestre A, Alcaraz MJ. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2018; 47(1): 11-25.
115. Liu X, Yang Y, Niu X, Lin Q, Zhao B, Wang Y, et al. An in situ photocrosslinkable platelet rich plasma-Complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomater* 2017; 62: 179-187.
116. Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, van der Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(5): 302-311.
117. Luo Z, Jiang L, Xu Y, Li H, Xu W, Wu S, et al. Mechano growth factor (MGF) and

- transforming growth factor (TGF)-beta3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model. *Biomaterials* 2015; 52: 463-475.
118. Singh B, Modica-Napolitano JS, Singh KK. Defining the momiome: Promiscuous information transfer by mobile mitochondria and the mitochondrial genome. *Semin Cancer Biol* 2017; 47: 1-17.
119. Chen P, Zheng L, Wang Y, Tao M, Xie Z, Xia C, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. *Theranostics* 2019; 9(9): 2439-2459.
120. Wu J, Kuang L, Chen C, Yang J, Zeng WN, Li T, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials* 2019; 206: 87-100.
121. Pang B, Zhu Y, Ni J, Thompson J, Malouf D, Bucci J, et al. Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. *Theranostics* 2020; 10(5): 2309-2326.
122. Cheng Y, Schorey JS. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 2013; 43(12): 3279-3290.
123. Yang VK, Loughran KA, Meola DM, Jühr CM, Thane KE, Davis AM, et al. Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. *J Extracell Vesicles* 2017; 6(1): 1350088.
124. Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(Suppl 3): 109-115.
125. Zhu Y, Wang Y, Zhao B, Niu X, Hu B, Li Q, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 64.
126. Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, Hui JHP, Lim SK, Toh WS. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials* 2018; 156: 16-27.
127. Liu X, Yang Y, Li Y, Niu X, Zhao B, Wang Y, et al. Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration. *Nanoscale* 2017; 9(13): 4430-4438.
128. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics* 2018; 8(5): 1399-1410.
129. Chen Z, Wang H, Xia Y, Yan F, Lu Y. Therapeutic Potential of Mesenchymal Cell-Derived miRNA-150-5p-Expressing Exosomes in Rheumatoid Arthritis Mediated by the Modulation of MMP14 and VEGF. *J Immunol* 2018; 201(8): 2472-2482.