

Isolation and characterization of exosomes separated from stem cells by ultra-centrifuge method

Shahrzad Nojehdehi¹, Seyed Mahmoud Hashemi^{2*}, Ardeshir Hesampour³

1. Department of Biology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.

2. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran/ Department of Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Biology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.

(Received: 2017/01/22 Accept: 2017/09/04)

Abstract

Background: In recent years, mesenchymal stem cell functions have been at the center of attention of researchers. Evidence shows that mesenchymal stem cells act as paracrine manner and thus, biological agents such as exosomes and soluble factors are present in the supernatant that can act as same as mesenchymal stem cells. Therefore, isolating exosomes from mesenchymal stem cells and determining their properties and their validation can be used to achieve therapeutic goals in autoimmune diseases and cancers. The use of exosomes isolated from soup and supernatant mesenchymal stem cell culture does not have any of the risks and problems of cell therapy, and also it is more effective than cell culture.

Materials and Methods: In this study, adipose-derived mesenchymal stem cells were used, after the identification of mesenchymal stem cells; mesenchymal stem cells were separated from supernatant using the ultra-centrifugation method. Concentration is determined by Bradford method and also their qualitative properties were determined using an electron microscope and Dynamic Light Scattering.

Findings: After culturing and passaging mesenchymal stem cells, supernatant were collected after 48 hours and its exosomes were separated with a diameter of 40 to 100 nm using an ultra-centrifuge with an approximate acceleration of 60000g. Its Average concentration was 630 mg/ml, and the electron microscope images show that the membrane was not damaged during the separation process and spherical structure was maintained. Analyzed results from the Light differential device shows that almost 70% of the particles have an average diameter of 50-90 nm.

Conclusion: Comparing the two methods of isolating with acceleration of 100,000g and 60000g from the results obtained in other experiments, exosome particles are more pure using acceleration of 10000 g, but using the acceleration 60,000 g, larger particles of exosomes such as microvesicle may be seen, but ultimately due to difficulty of accessing of a centrifuges with an approximate range of 100,000 gm, separation with the lower accelerations are also applicable. Also, the isolation of mesenchymal derived stem cell exosomes and its mass production may be considered as a bio-safe product in the treatment of diseases.

Keywords: Exosomes, Mesenchymal stem cells, separation, ultracentrifugation

*Corresponding author: Seyed Mahmoud Hashemi
Email: smhashemi@sbmu.ac.ir

جداسازی و تعیین خصوصیات اگزوزوم های جدا شده از سلول های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ

شهرزاد نوجه دهی^۱، دکتر سید محمود هاشمی^{۲*}، دکتر اردشیر حسام پور^۳

۱. گروه زیست شناسی واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران/گروه سلولی کاربردی، دانشکده فناوریهای نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. گروه زیست شناسی واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

چکیده:

سابقه و هدف: در سال های اخیر عملکردهای سلول های بنیادی مزانشیم در مرکز توجه قرار گرفته است. شواهد نشان می دهد سلول های بنیادی مزانشیم به شیوه ای پاراکرین عمل می کنند؛ بنابراین، عوامل بیولوژیکی از جمله اگزوزوم ها و عوامل محلول در آب، در محیط کشت سلول ها وجود دارند که می توانند عملکردی مشابه سلول های بنیادی مزانشیم داشته باشند. بنابراین جداسازی اگزوزوم ها از سلول های بنیادی مزانشیم و تعیین خصوصیت آن ها و تأییدشان می تواند جهت پیشبرد اهداف درمانی در بیماری هایی همانند بیماری های خود ایمن و سرطان مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از اگزوزوم های جدا شده از سوپ و مایع رویی کشت سلول های بنیادی مزانشیمی خطرات و مشکلات سلول درمانی را ندارد و همچنین کارایی بیشتری نسبت به مایع رویی کشت سلول دارد.

مواد و روش بررسی: در این مطالعه تجربی از بافت چربی، سلول های بنیادی مزانشیم استخراج شده است و پس از تعیین هویت سلول های بنیادی مزانشیم، از سوپ سلولی سلول های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش سانتریفیوژ تفریقی اگزوزوم ها جداسازی گردید. غلظت اگزوزوم ها با روش بردفورد تعیین و همچنین خصوصیات کیفی آن ها توسط میکروسکوپ الکترونی و دستگاه تفریقی نور تعیین شد.

یافته ها: بعد از کشت و پاساژ سلول های بنیادی مزانشیم، سوپ سلولی بعد از ۴۸ ساعت جمع آوری شده و با استفاده از سانتریفیوژ تفریقی با دور ۶۰۰۰g اگزوزوم های آن با اندازه ی تقریباً ۴۰ تا ۱۰۰ نانومتر جدا گردید. میانگین غلظت آن ۶۳۰ mg/ml بوده و در تصاویر میکروسکوپ الکترونی تمامیت غشا اگزوزوم ها طی فرایند جداسازی حفظ شده است و ساختار کروی دچار آسیب نشده است. نتایج آنالیز دستگاه تفریقی نور نشان می دهد که تقریباً ۷۰ درصد ذرات دارای میانگین قطر ۹۰-۵۰ نانومتر هستند.

نتیجه گیری: در مقایسه دو روش جداسازی ۱۰۰۰۰۰g و ۶۰۰۰۰g در نتایج به دست آمده در پژوهش های دیگر ذرات اگزوزوم در دور ۱۰۰۰۰g خالص تر می باشند ولی در دور ۶۰۰۰۰g ممکن است ذرات بزرگ تری از اگزوزوم مانند میکروویکول ها دیده شوند ولی در نهایت به علت دسترسی کمتر به اولترا سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰۰g، جداسازی با دور پایین تر هم کاربردی می باشد. همچنین جداسازی اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیم و تولید انبوه آن احتمالاً می تواند به عنوان یک محصول زیست ایمن در درمان بیماری ها مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اگزوزوم، سلول های بنیادی مزانشیم، جداسازی، اولتراسانتریفیوژ

* نویسنده مسئول: دکتر سید محمود هاشمی

پست الکترونیک: smmhashemi@sbmu.ac.ir

مقدمه:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی زیرمجموعه‌ای هتروژن از سلول‌های پروژنی‌تور پرتوان هستند و به دلیل قدرت تکثیر و تمایز بالا و ویژگی‌های ایمونولوژیک منبعی برای ترمیم بافتی هستند. این سلول‌ها از تعداد زیادی از ارگان‌ها مانند مغز استخوان، بافت چربی و... جدا شده‌اند. سلول‌های بنیادی بافت چربی با سرکوب استرس اکسیداتیو و التهاب، آسیب بافتی را کاهش می‌دهند (۱). اگزوزوم‌ها مشتق از سلول‌های بنیادی اعمالی شبیه به سلول‌های بنیادی مزانشیم، مانند ترمیم آسیب بافتی، مهار پاسخ‌های التهابی و تنظیم سیستم ایمنی بروز می‌دهند، استفاده از اگزوزوم‌ها خطراتی نظیر آنپلوئیدی و رد پیوند را ندارند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای درمان انواع بیماری‌ها باشند (۲).

اگزوزوم‌ها وزیکول‌های کوچکی با منشأ درون سلولی هستند که توسط بسیاری از انواع سلول‌های مختلف به فضای خارج سلولی آزاد می‌شوند. آن‌ها نقش کلیدی در ارتباطات بین سلولی تحت شرایط فیزیولوژیکال و پاتولوژیکال ایفا می‌کنند. اگزوزوم‌ها حاوی مقدار قابل‌توجهی از مولکول‌های RNA و پروتئین‌ها می‌باشند. همچنین اگزوزوم‌ها می‌توانند به منظور بررسی روند درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان‌ها نقش ایفا کنند. علاوه بر این ممکن است اگزوزوم‌ها به بهبود درمان‌های فردی یا خوددرمانی (مانند تزریق انسولین) استفاده شوند (۳).

هدف از این مطالعه جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیم از محیط کشت آن‌ها با استفاده از اولترا سانتریفیوژ با دور پایین‌تر و مقایسه دو روش می‌باشد و همچنین تعیین خصوصیات کیفی آن‌ها می‌باشد. جداسازی اگزوزوم‌ها صرفاً به منظور استفاده از آن‌ها به عنوان واسطه‌های ارتباط سلول-سلول و به طور بالقوه انتقال فنوتیپ سلول بنیادی به سلول‌های مقیم می‌باشد. علاوه بر این، قدرت سرکوب‌کنندگی ایمنی اگزوزوم‌های مشتق از سلول بنیادی در ایمنی درمانی سرطان و کاربردهای آینده آن‌ها در درمان‌های بدون سلول در طب آینده مورد بحث قرار خواهد گرفت (۴). همچنین در سال‌های اخیر استفاده از سوپ و مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برخی مطالعات در بیماری‌ها با موفقیت انجام شد؛ در مطالعات جدید نشان داده شده که اگزوزوم‌ها و میکرو وزیکول‌ها همانند سلول‌های مولد خود دارای آثار ایمونومودولاتوری و ایمونوساپرسوری هستند؛ مثلاً اگر میکرو وزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و یا سلول‌های ایمنی جداسازی کنیم دارای خواص سلول اولیه خواهند بود (۵). اگزوزوم‌ها شامل یک مجموعه لیگاند رستور، محتویات آنزیمی، سایتوکاین و مواد ژنتیکی سلول مبدأ می‌باشند که متعاقب اتصال و اینترنالیزه شدن به داخل سلول هدف منجر به ارسال پیام‌های تحریکی یا مهار، برنامه‌ریزی مجدد ژنتیکی و تغییر فنوتیپی در سلول‌های هدف می‌شوند (۶). روش‌های مورد استفاده در جداسازی اگزوزوم‌ها استفاده از اولترا سانتریفیوژ (UC-Exos)، سانتریفیوژ شیب چگالی (DG-Exos) و ستون‌های ایمونوافینیتی (IAC-Exos) می‌باشد. که در این مطالعه از روش اولترا سانتریفیوژ استفاده شده است (۷).

مواد و روشها:

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیم:

برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیم از بافت چربی بافت چربی محیط صفاقی موش C57/BL6 نر با رعایت اصول اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی کشته شده و بافت چربی ناحیه شکمی در شرایط استریل جدا شده و پس از شستشو با PBS محلولی نمکی بافر شده فسفات (PBS* یا Pospbate buffered saline) استریل که حاوی ۲۵ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و خرد کردن به وسیله تیغ جراحی با استفاده از کلاژناز نوع یک (سیگما) با غلظت ۰/۱ گرم درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شده تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰ g سلول‌های چربی از سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند. سپس رسوب به همراه محیط کشت کامل DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal Bovine Serum)، پنی سیلین، استرپتومایسین کشت داده شد و به فلاسک کشت منتقل شدند. تا پر شدن ۸۰٪ نگهداری شدند. بعد از ۴۸ ساعت محیط کاملاً تعویض شد و تا پر شدن ۸۰٪ از فلاسک هر ۳ یا ۴ روز یکبار دو سوم از محیط با محیط کشت تازه تعویض شد (۸).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم به سلول‌های چربی و استخوان:

به منظور تمایز از سلول‌های پاساژ ۲ استفاده شد. تعداد ۱۰ هزار سلول به پلیت چهارخانه منتقل و پس از ۴۸ ساعت محیط کشت خالی و ۱ میلی‌لیتر محیط استئوژنیک و آدیپوژنیک، اضافه شده و هر ۳ روز یکبار تعویض محیط صورت گرفته است. محیط استئوژنیک شامل دگزامتازون (۱۰۰ nM)، بتا گلیسیرول فسفات (۱۰ mM) و آسکوربیک اسید (۵۰ μM) به همراه ۱۰٪ FBS که به محیط DMEM اضافه شده، می‌باشد و محیط آدیپوژنیک شامل دگزامتازون (۲۵۰ nM)، ایزو متیل گزانتین (۰/۵ mM) و انسولین گاوی (۶۶ nM) و ایندومتاسین (۰/۵ mM) به همراه ۱۰٪ FBS که به محیط DMEM اضافه شده، می‌باشد (۹). به مدت ۲۱ روز محیط تمایزی هر ۳ روز یکبار تعویض شد. پس از ۲۱ روز به منظور بررسی تمایز از رنگ‌آمیزی آلزارین رد برای تأیید رده استخوانی و برای تأیید تشکیل واکوئل‌های چربی از رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد (۱۰).

جمع‌آوری سوپ سلولی و جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ:

برای جداسازی اگزوزوم‌ها، هنگامی که درصد پر شدگی سلول‌ها به ۹۰ درصد رسید، FBS از محیط کشت حذف شد و سوپ سلولی پس از ۴۸ ساعت جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری سوپ سلولی قدم اول برای تهیه اگزوزوم‌ها از محیط کشت رویی سلول‌های مزانشیمی حذف سلول‌های مرده و سلول‌های دارای دبری می‌باشد. سوپ‌های جمع‌آوری شده به مدت

(Surface Plasma Resonance یا SPR) برای این منظور استفاده می‌شود (۱۱) که در این تحقیق برای تعیین اندازه قطر آگروزوم‌ها با تکنیک DLS با استفاده از دستگاه زتا سائزر کمپانی Malvern اندازه ذرات موجود در ۱۰۰ میکرو لیتر از حلال، با استفاده از تابش و پراکندگی نور مشخص می‌شود. در این مطالعه حلال مورد استفاده بافر فسفات بود و ضریب شکست آن ۳۳/۱ با ویسکوزیته ۱/۰۸ می‌باشد. این اطلاعات برای تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار دستگاه ضروری بود. این روش غیر مخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده‌ی چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. ما در این جا به منظور آماده سازی آگروزوم‌ها را ۵ بار رقیق کرده و با دستگاه MALVERN/Zetasizer APS (www.malverninstruments.com) خوانده و آنالیز گردید (۱۲).

یافته‌ها:

بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیم و خصوصیات تمایزی:

نتایج مشاهدات مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس، مورفولوژی مشابه سلول‌های فیبروبلاستی را نشان داد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی صفاق موش‌ها در شرایط استریل جدا شدند و تکثیر یافتند. در پاساژ دوم پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با استفاده از محیط‌های القاکننده اختصاصی بررسی شد. با گذشت ۲۱ روز در پلیت های حاوی سلول و محیط تمایزی به آدیپوسیت، وزیکول های لیپیدی پس از رنگ آمیزی با Oil Red دیده شدند شکل ۱ (B). همچنین با استفاده از محیط استئوژنیک، به مدت ۲۱ روز و سپس رنگ آمیزی با Alizarin Red رسوبات کلسیم به صورت نواحی قرمز رنگ به خوبی قابل مشاهده است شکل ۱ (C).

بررسی آگروزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی:

تأیید کیفیت و ساختار آگروزوم‌ها با تکنیک TEM:

با استفاده از تکنیک TEM ساختار آگروزوم‌ها به صورت میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. تمامیت غشا آگروزوم هاطی فرایند جداسازی حفظ شده و ساختار کروی دچار آسیب نشده است. همچنین در این تصویر قطر آگروزوم‌ها ۱۰۰ نانومتر و کمتر از آن می‌باشد. با استفاده از میکروسکوپ SEM آگروزوم‌های کوچک با مورفولوژی کروی در تصاویر دیده شدند. دامنه اندازه آگروزوم‌ها بین ۴۰ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که در تصاویر تأیید شده است (۱۳).

با استفاده از محلول Bradford و تهیه رقت‌های متوالی از پروتئین BSA که غلظت آن مشخص بود منحنی استاندارد تعیین غلظت پروتئین به دست آمد. با استفاده از فرمول خط نمودار فوق مقادیر غلظت پروتئین آگروزوم جداسازی محاسبه گردیده است که مقدار آن ۶۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. هدف از انجام این تست تعیین وجود پروتئین در نمونه به دست آمده می‌باشد که برای تعیین پروتئین‌های اختصاصی آگروزوم با از روش وسترن بلات استفاده کرد.

نتایج به دست آمده از آنالیز DLS:

با استفاده از دستگاه MALVERN با استفاده از تکنیک DLS قطر ذرات موجود در سوسپانسیون آگروزوم جداسازی شده از سلول‌ها تعیین گردید. همان طور که در شکل ۵ آمده تقریباً ۷۷ درصد ذرات دارای میانگین قطر بین ۷۹

۲۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مجدد سوپ بالایی نگه‌داری و پلت سلولی خارج و اوت گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیفیوژ گردید. مجدد سوپ بالایی نگه‌داری شد و پلت سلولی خارج و اوت گردید. در آخر به مدت ۹۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیفیوژ (Beckman L5-65) گردید. در این مرحله مایع رویی به آرامی خارج و پلت به وسیله 1 ml PBS استریل سوسپانسیون گردید. روش‌های مورد استفاده در جداسازی آگروزوم‌ها استفاده از اولترا سانتریفیوژ (UC-Exos)، سانتیفیوژ شیب چگالی (DG-Exos) و ستون‌های ایمونوآفینیتی (IAC-Exos) می‌باشد. که در این مطالعه از روش اولترا سانتیفیوژ استفاده شده است (۱۱).

تعیین خصوصیات آگروزوم‌های جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیم:

۱- عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی:

برای مشاهده مورفولوژی آگروزوم‌ها از میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM استفاده شد و بدین منظور که برای آماده سازی نمونه برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM)، سوسپانسیون به دست آمده بعد از اولترا سانتیفیوژ، با استفاده از پارافارمالدهید ۲ درصد فیکس شده و پس از آن در آب مقطر رقیق می‌شود، سپس ۱ تا ۵ میکرو لیتر از نمونه را بر روی تراشه‌های سیلیکونی انتقال داده و به منظور آب زدایی و خشک کردن، در استون به مدت ۵ دقیقه قرار گیرد و سپس به وسیله آب شسته و خشک شود؛ و سپس عکس‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM (شرکت KYKY، مدل EM 3200 <http://www.industrysourcing.com/product/kyky-em3200-digital-scanning-electron-microscope>) با ولتاژ انتخابی ۳۰Kv گرفته شد (۱۰).

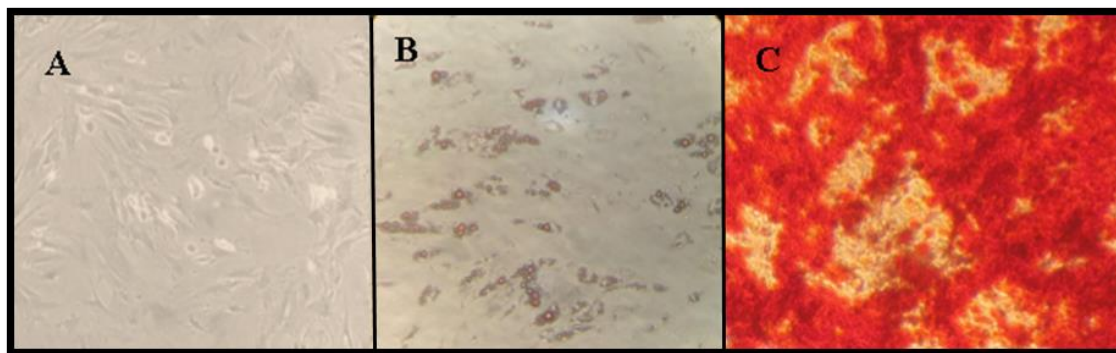
به منظور آماده سازی برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، در ابتدا سوسپانسیون آگروزوم با استفاده از گلاتارالدهید ۱ درصد فیکس شده و یک قطره بر روی گرید کت شده با کربن قرار داده و در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. سپس گرید‌ها دو بار به مدت ۵ دقیقه با PBS استریل شسته شدند و بعد از آن با رنگ یورانیل استات ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. بررسی‌های مربوط به مورفولوژی و اندازه آگروزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM LEO 906 (شرکت zeiss، <https://www.micro-shop.zeiss.com>) در ولتاژ ۸۰Kv انجام گرفت و عکس‌ها تهیه گردید (۱۱).

۲- تعیین غلظت آگروزوم‌ها با استفاده از روش بردفورد:

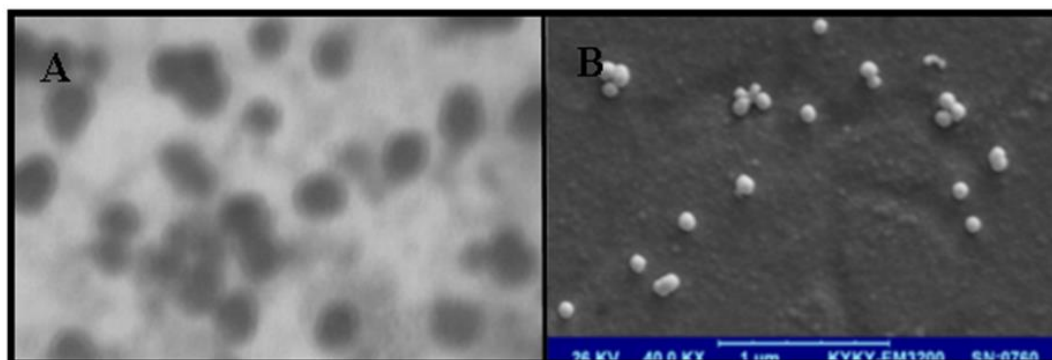
به منظور تعیین مقدار آگروزوم جداسازی شده، پروتئین آن را با استفاده از محلول Bradford و رسم نمودار استاندارد با استفاده از رقت‌های متوالی شده از پروتئین BSA با غلظت مشخص، تعیین گردید.

۳- تعیین اندازه و درصد آگروزوم‌ها با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS):

برای ردیابی آگروزوم‌ها روش‌های نوینی نظیر (Immunoaffinity Nanoparticle tracking based capture method یا IAC)، (Dynamic Light Scattering یا DLS) و analysis (NTA)،



شکل ۱ (A): سلول های بنیادی مزانشیم در پاساژ دوم به شکل دوکی و شبه فیبروبلاست دیده می شوند. (B): تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی رنگ آمیزی اوایل رد. (C): رنگ آمیزی آلیزارین رد جهت مشاهده سلول های تمایز یافته به بافت استخوانی.



شکل ۲ (A) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم با تکنیک TEM (رنگ آمیزی یورانیل استات). در این تصویر دولایه بودن غشای اگزوزوم ها مشخص می باشد. (B): تصویر به دست آمده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM). اندازه اگزوزوم ها بین ۴۰ تا ۱۰۰ نانومتر تأیید شده است و همچنین کروی بودن آن ها در تصویر دیده می شود.

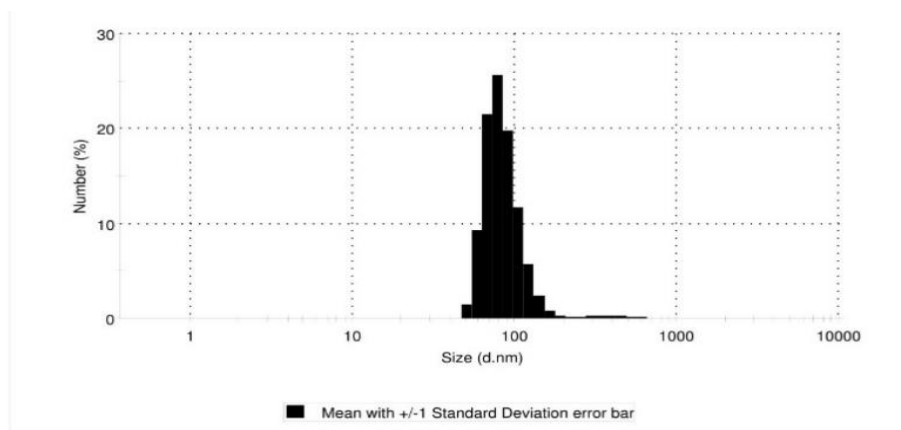
در این پژوهش ما توانستیم با استفاده از اولترا سانتریفیوژ با دور ۶۰,۰۰۰ g اگزوزم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موجود در سوپ سلولی را جداسازی کرده و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی خصوصیات آن ها را تعیین نماییم. همچنین با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) تقریباً ۷۰ درصد میکرووزیکول های جدا شده با روش اولترا سانتریفیوژ تقریباً ۷۷ درصد ذرات دارای میانگین قطر بین ۷۹ نانومتر هستند. همچنین در مقایسه دو روش جداسازی ۱۰۰,۰۰۰ g و ۶۰,۰۰۰ g در نتایج بدست آمده در پژوهش های دیگر ذرات اگزوزوم در دور ۱۰,۰۰۰ g (روش they و همکاران) خالص تر می باشند ولی در دور ۶۰,۰۰۰ g ممکن است ذرات بزرگتری از اگزوزوم مانند میکرووزیکول ها دیده شوند. به طور کلی روش جداسازی اگزوزوم ها با استفاده از ستون های ایمونوآفینی روشی کاربردی تر و با محصول بیشتر و نسبت مارکر های سطحی از جمله Alix و TSG101 بیشتر بوده ولی در عین حال روش گران تری نسبت به دو روش دیگر می باشد (۱۵).

با توجه به اینکه سلول های بنیادی مزانشیمی دارای آثار ایمونومودولاتوری هستند کاندید مناسبی برای ایمونوتراپی بیماری های اتوایمونی هستند. در

نانومتر هستند. این نتایج، روش جداسازی اگزوزوم ها و قطر آن ها را به صورت کمی تأیید کرد.

بحث:

تفاوت در روش های جداسازی اگزوزوم ها بر این اساس است که کدام روش موثرترین توانایی را برای جداسازی اگزوزوم ها دارد. همچنین حذف پارتنیکل های اضافی و کنستانتیه های پروتئین هم در روش های استاندارد جداسازی مورد توجه می باشد (۱۴). در پژوهش های انجام شده، دو روش اولترا سانتریفیوژ را با روش سانتریفیوژ شیب چگالی مقایسه کرده اند که نتایج به دست آمده از مقایسه این دو روش نشان می دهد که سانتریفیوژ شیب چگالی روشی موثر تری می باشد در صورتی که اولترا سانتریفیوژ روش ارزان تری محسوب می شود (۱۵). بر اساس خواص ایمونوآفینیتی و تعامل آنتی ژن و آنتی بادی، تکنیک های IAC و SPR به منظور حساسیت بیشتر پیشنهاد می شوند. با توجه مسائل مربوط به هزینه، NTA، AF4 و DLS نسبتاً مقرون به صرفه تر هستند (۱۶). ولی ارزان ترین روش که زمان کمتری هم نیاز دارد DLS می باشد (۱۱).



شکل ۳ نتایج به دست آمده از آنالیز DLS با استفاده از دستگاه MALVERN که محدوده اندازه اگزوزوم ها تعیین شده است.

Cerulein و پانکراتیت حاد شدید القا شده با سدیم توروکولات کاهش داد. میکرو وزیکول های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، نرخ بقای سلول های آسینار پانکراسی را در پانکراتیت حاد ملایم القا شده با Cerulein و پانکراتیت حاد شدید القا شده با توروکولات در مدل های آزمایشگاهی بهبود بخشید. میکرو وزیکول های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با کاهش سطح سیتوکین های پیش التهابی و تنظیم جابه جایی هسته ای NFκBp65 نقش حفاظتی را در پانکراتیت حاد بازی می کنند. میکرو وزیکول های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می توانند به عنوان یک استراتژی برای درمان بالینی پانکراتیت حاد شدید القا شده با سدیم توروکولات استفاده شود (۱۹).

نتیجه گیری:

در آخر استفاده درمانی از اگزوزوم ها به عنوان یک روش درمانی غیر سلولی یکسری مزایایی دارد که می تواند توجیه مناسبی برای جایگزینی آن در روش های معمول سلول درمانی باشد. استفاده از اگزوزوم های جدا شده از مایع رویی کشت سلول های بنیادی خطرات و مشکلات سلول درمانی را ندارد و همچنین کارایی بیشتری نسبت به مایع رویی کشت سلول دارد. در بحث سلول درمانی با توجه به مشکلات تزریق سلول به بیمار اگر از فرآورده های سلول های بنیادی بجای خود سلول استفاده کنیم عوارض سلول درمانی را نداشته و زود تر به مرحله درمان انسانی خواهد رسید.

تشکر و قدردانی:

مقاله ی حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان نامه ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز می باشد. بدین وسیله از اساتید محترم جناب آقای دکتر هاشمی و جناب آقای دکتر حسام پور برای راهنمایی های بی دریغشان کمال تشکر را دارم. همچنین از مرکز تحقیقات بن یاخته صمیمانه سپاسگزاری می کنم.

شرایط طبیعی و پاتولوژیک سلول های بدن از غشا خود وزیکول هایی با نام میکرو وزیکول ها و اگزوزوم ها آزاد می کنند که در سال های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این وزیکول ها محتوی ترکیبات پروتئینی و گلیکو پروتئینی و فسفولیپیدی غشا از جمله رستور ها و مولکول های سطح سلول می باشند. همچنین بسیاری از مولکول های موجود در سیتوزول نیز در داخل این وزیکول ها موجود است؛ بنابراین با توجه به مشکلات و عوارض موجود در تزریق مستقیم سلول های بنیادی استفاده از میکرو وزیکول ها و اگزوزوم ها بجای تزریق مستقیم سلول های بنیادی می تواند به عنوان روش جایگزین سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۱۷).

در مطالعاتی که انجام شده، ارزیابی کارایی درمانی اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیم در مهار پاسخ های التهابی لنفوسیت های خود واکشگر زیر رده های TH1, TH17 و تخفیف شدت علائم بالینی در انسفالومیلیت تجربی خود ایمن است. در این تحقیق متعاقب القا بیماری در موش های C57/BL6 و ظهور علائم بیماری، موش ها تحت تزریق اگزوزوم قرار گرفتند. داده ها نشان داده بودند که سلول های بنیادی و اگزوزوم های مشتق از آن ها از طریق کاهش ترشح سایتوکاین ها التهابی IL17، اینترفرون گاما، افزایش سایتوکاین های ضد التهابی TGF-β و IL-10 و مهار تکثیر آبی ژنیک در لنفوسیت های T خود واکشگر قادر به تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری می باشند (۱۸).

همچنین در مطالعه ی دیگری سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) اثر حفاظت کنندگی واضحی را روی پانکراتیت حاد (AP) نشان داده اند. هدف از این مطالعه آنالیز اثر میکرو وزیکول های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (bmMSC-MVs) روی پانکراتیت حاد و کشف مکانیسم های دخیل بود. میکرو وزیکول های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان آسیب پانکراسی حاد را در پانکراتیت حاد ملایم القا شده با Cerulein و پانکراتیت حاد شدید القا شده با سدیم توروکولات را با تنظیم اینترلوکین ۱ آلفا و TNF آلفا کاهش داد و به طور درمانیکی جابه جایی هسته ای NFκBp65 را در پانکراتیت حاد ملایم القا شده با

منابع:

1. Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-beni B, Zarkesh-esfahani SH. Phenotypic Characterizations and Comparison of Adult Dental Stem Cells with Adipose-Derived Stem Cells 2010; 1(3).
2. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* [Internet] 2014; 15(3): 4142–4157.
3. Marleau AM, Chen C-S, Joyce JA, Tullis RH. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *Journal of Translational Medicine* 2012. p. 134.
4. Physiology C. Mesenchymal Stem Cell – Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation 2015; 2415–2424.
5. Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012; 40(1): 130–138.
6. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ. The Biogenesis and Functions of Exosomes 2002; 321–330.
7. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.
8. Hashemi SM, Hassan ZM, Pourfathollah AA, Soudi S, Shafiee A, Soleimani M. *Cellular Biochemistry* 2013; 965(October 2012): 955–965.
9. Data F, Cd A, Cd CD, Thy CD, Endoglin CD, Alcam CD, et al. Mesenchymal Stem Cell & Differentiation Markers. 1–8.
10. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 2003; 69(3): 250–256.
11. Review I. Innovation in detection of microparticles and exosomes 2013; 11:36–45.
12. Ultracentrifugation E, Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. Chapter 15.
13. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegman AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma 2015; 1: 1–11.
14. Zhang Z, Wang C, Li T, Liu ZHE, Li L. Comparison of ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line - derived exosomes 2014; 1701–1706.
15. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, et al. Comparison of ultracentrifugation , density gradient separation , and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* [Internet]. Elsevier Inc 2012; 56(2): 293–304.
16. Chia BS, Low YP, Wang Q, Li P, Gao Z. Advances in Exosome Quantification Techniques. *Trends Anal Chem* [Internet]. Elsevier Ltd 2016; 86(April 2017): 93–106.
17. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-menocal L, Salgado M, Badiavas E Van. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis *In Vitro* 2015; 24(14): 1635–1647.
18. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid A, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* [Internet]. Elsevier BV 2012; 147(1-2): 47–54.
19. Yin G, Hu G, Wan R, Yu G, Cang X, Xiong J, et al. Role of Microvesicles From Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Acute Pancreatitis. *Pancreas* [Internet] 2016; 62(3): 1.