Archive of SID

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2021;10(2):101-108

Journal of Police Medicine

Journal Homepage: http://jpmed.ir

Original Article Open Access

Isolation and Characterization of Human Blood Extracellular Vesicles: a Promising Method of Fluid Biopsy

Faezeh Shekari[1], Shirin Jalili[2], Fereshteh Rahmati[3]*

[1] Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Cell Science Research Center, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Tehran, Iran.
[2] Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran.
[3] Faculty of Biology, Department of Biochemistry. Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Aims: Extracellular vesicles (EV) are nanoscale vesicles that were previously thought to be secreted into the bloodstream by apoptotic cells. Today, EVs have been demonstrated to be secreted by almost all cells in the body, which contain valuable biomarkers for early diagnosis of a wide variety of diseases, particularly cancers. Efficient separation of EVs encounter challenges due to the presence of proteins and lipoproteins. Hence, the need for a time-saving and non-invasive diagnostic method with the ability to quantify isolated EVs, which is also applicable to resource-limited situations, can be the major necessities to advance EV-based diagnostic studies. The aim of the present study was to provide a relatively rapid and efficient method for isolating EV from blood as an important biological fluid in humans.

Materials & Methods: In this case study, with the combination of size exclusion chromatography and ultracentrifuge, EVs were successfully isolated from human blood plasma samples within an hour. To confirm the isolation process according to MISEV guidelines, three tetraspanin membrane proteins CD63, CD81, CD9, and one luminal protein TG101, were evaluated as positive protein markers and connexin protein as a negative marker by Western blot.

Findings: The maximum presence of positive markers and the absence of negative markers in F7 to F9 fractions were confirmed. Additionally, their size distribution evaluation was done using the DLS technique with an average diameter in the range of 100 nm. Quantification of the protein content of EVs was also performed by BCA assay.

Conclusion: The present study shows that the combination of high-speed centrifugation and size-based chromatography methods is very effective in isolating EV from the blood plasma of individuals.

KEYWORD: Extracellular vesicles, Isolation, Biomarkers, Size exclusion chromatography,

How to cite this article
Faezeh Shekari F, Jalili S, Rahmati F. *Isolation and Characterization of Human Blood Extracellular Vesicles: a Promising Method of Fluid Biopsy.* J Police Med. 2021;10(2):101-108.

***Correspondence:**
Address: Faculty of Biology, Department of Biochemistry. Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Postal Code: -
Tel: -
Fax: -
Mail:
noora_1232003@yahoo.com

Article History
Received: 13/02/2021
Accepted: 28/02/2021
ePublished: 04/04/2021

CITATION LINKS

[1] Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles ... [2] Apoptotic bodies from endothelial cells enhance ... [3] Gesicles: microvesicle "cookies" for ... [4] Extracellular vesicles: a new frontier ... [5] Extracellular vesicles during Herpes ... [6] Extracellular vesicle isolation and characterization ... [7] Biological properties of extracellular vesicles ... [8]extracellular Vesicles in cell Biology ... [9] Characterisation of extracellular vesicle-subsets ... [10] Tetraspanins in extracellular vesicle formation ... [11] Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Tumor ... [12] Extracellular vesicle-transported ... [13] Endosomal signalling via exosome surface ... [14] EGFR detection in extracellular vesicles of breast ... [15] Exosomes account for vesicle-mediated ... [16] Lipids in exosomes: current knowledge and the ... [17] Extracellular vesicles and their nucleic acids for ... [18] Heterogeneity and interplay of the extracellular vesicle ... [19] Small non-coding RNA landscape of extracellular vesicles ... [20] Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy'in ... [21] Extracellular vesicles in cancer detection ... [22] Extracellular vesicles as potential biomarkers ... [23] Extracellular vesicles in diagnostics and therapy ... [24] Extracellular vesicles in lung disease ... [25] Role of extracellular vesicles in hematological ... [26] Minimal information for studies of extracellular vesicles ... [27] Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer ... [28] Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic ... [29] Microvesicle-and exosome-mediated drug delivery enhances ... [30] Standardization of sample collection, isolation and analysis ... [31] A comparison of methods for the isolation and separation ... [32] Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed research international. 2018 Oct;2018.

Copyright © 2021, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

www.SID.ir

Archive of SID

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2021;10(2):101-108

مجله طب انتظامی

وب‌سایت مجله: http://jpmed.ir

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

جداسازی و مشخصه‌یابی وزیکول‌های برون سلولی از نمونه خون انسان: یک روش امیدبخش در بیوپسی مایع

فائزه شکری[1]، شیرین جلیلی[2]، فرشته رحمتی[3*]

[1] موسسه زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی رویان، ACECR، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی، تهران، ایران
[2] پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران
[3] دانشکده زیست شناسی، دپارتمان بیوشیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: وزیکول‌های خارج سلولی، تقریباً توسط تمامی سلول‌های بدن ترشح می‌شوند و حاوی بیومارکرهای ارزشمندی هستند که می‌توان از آن در جهت تشخیص زودهنگام انواع بیماری‌ها بخصوص در حوزه سرطان بهره برد. نیاز به یک متد تشخیصی سریع و کارآمد با قابلیت کمیت سنجی EVs جداسازی شده که در عین حال قابل اجرا در شرایط کمبود تجهیزات آزمایشگاهی و غیرتهاجمی باشد، می‌تواند از جمله ضروریات در جهت پیشبرد مطالعات تشخیصی مبتنی بر EVs باشد. هدف از تحقیق حاضر ارئه روش نسبتا سریع و کارامد به منظور جداسازی EVs از خون به عنوان یک مایع بیولوژیک مهم در انسان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی با تلفیق دو روش کروماتوگرافی مبتنی براندازه و سانتریفیوژ دور بالا، EVsدر طی یک ساعت با موفقیت از پلاسما انسان جداسازی شدند. جهت تائید فرایند جداسازی مطابق با معیارهای مایسیو، سه پروتئین غشایی تتراسپینن CD63، CD9،CD81 و یک پروتئین لومنال TG101 به عنوان شاخص¬های پروتئینی مثبت و پروتئین کانکسین به عنوان مارکر منفی به کمک وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: حضور حداکثری مارکرهای مثبت و عدم حضور مارکر منفی در فرکشن‌های ۷ الی ۹ تائید شد. علاوه بر این، توزیع اندازه آنها به کمک تکنیک DLS با میانگین قطر در محدوده ۱۰۰ نانومتر صورت گرفت. کمیت‌سنجی مقدار محتوای پروتئینی EVs نیز با سنجش BCA انجام شد.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر مبین آن است که تلفیق روش‌های سانتریفیوژ دور بالا و کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه به منظور جداسازی EVs از پلاسمای خون افراد بسیار کارامد است.

کلیدواژه‌ها: وزیکول‌های خارج سلولی، جداسازی، نشانگر، کروماتوگرافی مبتنی براندازه، پراکندگی نور پویا

نحوه استناد به این مقاله
Faezeh Shekari F, Jalili S, Rahmati F. *Isolation and Characterization of Human Blood Extracellular Vesicles: a Promising Method of Fluid Biopsy.* J Police Med. 2021;10(2):101-108.

نویسنده مسئول*:
آدرس پستی: فرشته رحمتی- دانشکده زیست شناسی، دپارتمان بیوشیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
کدپستی: -
تلفن ثابت: -
فکس: -
پست الکترونیک:
noora_1232003@yahoo.com

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰
چاپ: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵

لینک‌های استناد

[1] Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles ... [2] Apoptotic bodies from endothelial cells enhance ... [3] Gesicles: microvesicle "cookies" for ... [4] Extracellular vesicles: a new frontier ... [5] Extracellular vesicles during Herpes ... [6] Extracellular vesicle isolation and characterization ... [7] Biological properties of extracellular vesicles ... [8]extracellular Vesicles in cell Biology ... [9] Characterisation of extracellular vesicle-subsets ... [10] Tetraspanins in extracellular vesicle formation ... [11] Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Tumor ... [12] Extracellular vesicle-transported ... [13] Endosomal signalling via exosome surface ... [14] EGFR detection in extracellular vesicles of breast ... [15] Exosomes account for vesicle-mediated ... [16] Lipids in exosomes: current knowledge and the ... [17] Extracellular vesicles and their nucleic acids for ... [18] Heterogeneity and interplay of the extracellular vesicle ... [19] Small non-coding RNA landscape of extracellular vesicles ... [20] Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy'in ... [21] Extracellular vesicles in cancer detection ... [22] Extracellular vesicles as potential biomarkers ... [23] Extracellular vesicles in diagnostics and therapy ... [24] Extracellular vesicles in lung disease ... [25] Role of extracellular vesicles in hematological ... [26] Minimal information for studies of extracellular vesicles ... [27] Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer ... [28] Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic ... [29] Microvesicle-and exosome-mediated drug delivery enhances ... [30] Standardization of sample collection, isolation and analysis ... [31] A comparison of methods for the isolation and separation ... [32] Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed research international. 2018 Oct;2018.

Copyright © 2021, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ارتباطات بین سلولی مشخصه اصلی موجودات پُرسلولی است که به دو صورت تماس سلول-سلول و انتقال مولکول‌های ترشحی امکان‌پذیر است [۱]. از دیرباز توانایی سلول‌ها جهت آزادسازی وزیکول‌ها به محیط خارج سلولی طی فرایند آپوپتوز، مطرح بوده است. بااین‌وجود، این واقعیت که سلول‌های سالم نیز وزیکول‌هایی را به محیط خارج سلول آزاد می‌کنند، اخیراً شناخته‌شده است [۲].

وزیکول‌های خارج سلولی (Extracellular Vesicles (EVs) گروهی ناهمگن از ساختارهای مشتق شده از غشای سلولی هستند که توسط سلول‌های مختلفی ازجمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های دندریتیکی، نورون‌ها، پلاکت‌ها، سلول‌های اندوتلیال، اپی تلیال و ... ترشح می‌شوند [۳]. EVs با توجه به مکانیسم تولید، منشأ یا اندازه در سه زیر کلاس اجسام آپوپتوتیک Apoptotic bodies، میکروووزیکول‌ها (microvesicles) و اگزوزوم‌ها (exosomes) طبقه‌بندی می‌شوند. در طی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، سلول‌ها اجسام آپوپتوتیک با ابعاد ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ نانومتر را آزاد می‌کنند [٤]. میکروووزیکول‌ها که به آن‌ها اکتوزوم نیز گفته می‌شود، طی فرایند جوانه‌زنی از غشا با اندازه ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر تولید می‌شوند [٥]. کوچک‌ترین EVs، اگزوزوم‌ها (۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر) هستند که محل تولید آن‌ها در درون سلول و از طریق جوانه‌زنی داخلی وزیکول‌ها در حفره لومنی اندوزوم اولیه است [٦]. البته در سال‌های اخیر مشخص‌شده است که فارغ از نوع مسیر بیوژنز، اندازه این وزیکول‌ها با یکدیگر همپوشانی دارد و نمی‌توان اندازه دقیق و مشخصی برای هر دسته اعلام کرد. EVs در مایعات مختلف بدن ازجمله خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار، بزاق، مایع آمنیوتیک، اشک و ... یافت می‌شوند [۷]. EVs حاوی انواع پروتئین‌ها، گیرنده‌ها، لیپیدها، و نوکلئیک اسیدها هستند که این ترکیبات هم در درون محفظه آبی و هم در بین دولایه فسفولیپیدی قرار دارند [۸]. هرچند که محتویات آن‌ها می‌تواند مطابق با روند بیوژنز و منشأ سلولی متفاوت باشند، اما پروتئین‌های مرتبط با عملکرد غشا (ICAM، اینتگرین‌ها)، بیوژنز EV (TSG101, ALIX)، جذب و آزادسازی (Annexins, Rab proteins) به‌طورمعمول در آن‌ها یافت می‌شوند [۹]. علاوه بر این، طیف وسیعی از تتراسپانین‌ها مثل CD9، CD37، CD53، CD63، CD81، CD82 [۱۰]، پروتئین‌های مربوط به ارائه آنتی‌ژن مثل HLA-G، MHC، سیتوکین‌ها مثل VEGF-A [۱۱]، سمافورین 3A (Sema 3A) [۱۲]، TGF-beta [۱۳] و EGFR VIII [۱٤] نیز می‌توانند حضورداشته باشند.

محتوای لیپیدی EVs هنوز به‌طور کامل بررسی نشده است. بااین‌وجود پژوهش‌ها بیانگر غنای دولایه لیپیدی آن‌ها از اسفنگومیلین، کلسترول، فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیل اتانول‌آمین، فسفاتیدیل سرین، پروستاگلاندین GM3 است [۱٥،۱٦].

EVs ازنظر ماهیت محتوای نوکلئیک‌اسیدی متنوع هستند [۱۷]. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که نوکلئیک‌اسیدهای موجود در EVs اغلب از نوع RNAهای کوچک به‌ویژه rRNAها، و tRNAها هستند [۱۸]. البته RNAهای کوچک دیگری نیز وجود دارند، به‌عنوان‌مثال non-codingهای کوتاه و بلند، mRNAها و miRNAها [۱۹]. داده‌هایی در خصوص حضور محتوای DNA میتوکندریایی و ژنومی در EVs کمیاب موجود است.

ازآنجایی‌که همواره یک نیاز اساسی در ایجاد ابزارهای تشخیصی وجود دارد که ارزیابی به‌موقع بیماری و پاسخ درمانی مناسب و زودهنگام را فراهم نماید، در سال‌های اخیر علاقه فزاینده‌ای به EVs به‌عنوان یک پلتفرم که حاوی انواع نشانگرهای زیستی هستند و به‌عنوان یک نمایشگر از وضعیت سلول‌های هدف عمل می‌کنند به وجود آمده است. درواقع می‌توان EVs را به‌عنوان یک بستر بیوپسی در حوزه تشخیص زودهنگام و درمان لحاظ کرد [۲۰]. EVs در ابتدا به‌عنوان راهی برای هومئوستاز و دفع مواد زائد بیولوژیک از سلول‌ها توصیف می‌شوند.

امروزه نقش مهم و تأثیرگذار EVs در جریان ارتباطات بین سلولی، نه‌تنها در عملکردهای نرمال بلکه در شرایط بیماری در امراضی مثل سرطان [۲۱]، بیماری‌های خود ایمنی [۲۲]، قلبی-عروقی [۲۳]، تنفسی [۲٤] بسیار مشهود است. همچنین EVs از طریق القاء بیان ژن در سلول‌های هدف ممکن است بر بازسازی استرومای مغز استخوان، عملکرد سلول‌های هدف، آنژیوژنز، پیشرفت و متاستاز بدخیمی‌های خونی تأثیرگذار باشند [۲٥]. بدین‌جهت به‌کارگیری و بهینه‌سازی روش‌های مختلف استخراج EVsامروزه بسیار موردتوجه قرارگرفته است.

مطالعه وزیکول‌ها بسیار چالش‌برانگیز است. تاکنون، در مورد مناسب‌ترین روش‌ها برای توصیف یا جداسازی EVs، اتفاق‌نظر وجود نداشته است. محققین حوزه وزیکول‌ها (اگزوزوم‌ها، میکروزیکول‌ها یا ذرات مشابه)، به دلیل کاستی‌های موجود در روش‌های آنالیز وزیکول، از قابلیت اعتبار داده‌ها در رابطه با ترکیب عملکردی، فیزیکی و بیوشیمیایی وزیکول‌ها مطمئن نیستند. برای مقابله با ابهام در روش‌های مناسب، انجمن بین‌المللی وزیکول‌های خارج سلولی (ISEV) مجموعه‌ای از معیارها را برای مطالعه EVs ایجاد کرده است تا داده‌های دقیق و معتبر را منتشر نماید. این دستورالعمل‌ها که برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ به‌عنوان حداقل اطلاعات برای مطالعه EVs در مجله خارج سلولی وزیکول منتشر شد و تحت عنوان دستورالعمل مایسیو (MISEV guidelines) شناخته می‌شوند، اکنون به‌روزرسانی شده و به‌طور منظم منتشر می‌گردند تا همگام با فضای تحقیقاتی که به‌سرعت در حال تحول است، همگام شوند. آخرین دستورالعمل‌های مایسیو توسط ویتور (Witwer) و همکاران منتشرشده است [۲٦].

امروزه تشخیص‌های مبتنی بر EVs می‌تواند در حوزه نظارت و پایش بر وضعیت سلامت کارکنان نیروهای عملیاتی و نظامی مورداستفاده قرار گیرد. لذا دسترسی سریع و آسان به این متد تشخیصی همه‌جانبه امری ضروری است.

هدف از مطالعه حاضر ارائه یک روش جداسازی مناسب، شناسایی، و کمی سازی این مخازن کوچک حاوی بیومولکول‌های زیستی است که امکان تشخیص سریع، زودهنگام، و غیرتهاجمی بیماری‌ها را فراهم می‌سازد.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در موسسه زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، ACECR، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی، تهران، ایران در تابستان ۱۳۹۹ انجام شد.

مواد تخصصی لازم برای این پژوهش به شرح ذیل خریداری شد:

غشای الکتروفورتیک (PVDF): (Bio-Rad-Millipore, Germany)، آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای TSG101 (۱:۵۰۰, Gentex, USA) و CD81 (۱:۵۰۰, Santa Cruz, Germany) و نشانگر منفی کالنکسین (۱:۵۰۰, Santa Cruz, Germany)- BSA ، sigma - کیت BCA Protein Assey)

تهیه نمونه‌های خونی. به‌منظور جداسازی و استخراج EVs از افراد مرد سالم داوطلب در آزمایشگاه ۵ سی‌سی خون در لوله‌های خون‌گیری جمع‌آوری شد.

جداسازی EVs از نمونه پلاسما توسط ستون‌های qEV original. پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون و جداسازی اجزا غیر سلولی آن به‌منظور استفاده از پلاسمای خون، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی g۱۰۰۰ تا g۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد.

- جداسازی EVs از نمونه پلاسما توسط ستون‌های qEV original انجام شد. این ستون‌های حذف اندازه (size exclusion chromatography)، جداسازی سریع وزیکول‌های خارج سلولی را از سلول‌های اضافی و مایعات پیچیده بیولوژیکی امکان‌پذیر می‌کند. هر ستون با حفظ خواص بیولوژیکی EVs، پروتئین‌های پس‌زمینه، لیپیدها، املاح و سایر آلاینده‌ها را به‌منظور بهبود حساسیت و دقت سنجش‌ها به‌خوبی حذف می‌کند. جداسازی EVs از نمونه‌های پلاسمای تهیه‌شده توسط ستون‌های qEV original دارای بیشینه حجم بارگذاری (Loading) در هر دفعه به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بوده و با این مقدار حداکثر ظرفیت استفاده از ستون، ۵ بار است.
- قبل از استفاده از ستون، ابتدا روی پایه مخصوصی قرار داده شد و درپوش بالا برداشته و سدیم آزید داخل ستون به‌آرامی و به‌طور کامل خارج شد. سپس ستون با PBS پر شد و درپوش پائینی ستون برداشته شد تا PBS به‌آرامی و قطره‌قطره خارج شود. سپس، متناسب با حجم شستشو (Flushing volume)، حداقل ۱۵ میلی‌لیتر PBS از ستون عبور داده شد تا شستشو کامل انجام شود.
- به‌محض تخلیه ناحیه فوقانی ستون از PBS، نمونه پلاسما به داخل ستون منتقل شد و بلافاصله فراکشن‌های (Fraction) نیم میلی‌لیتری از PBS جمع‌آوری گردید.
- ازآنجایی‌که حجم دورریز (Void volume) ستون به‌اندازه ۲/۸ میلی‌لیتر است، پس از ۶ فراکشن نیم میلی‌لیتری، ۴ فراکشن بعدی (۷ تا ۱۰) به‌عنوان نمونه‌های حاوی EVs لحاظ شد.
- در مرحله بعد، جهت تغلیظ و کاهش حجم نمونه، از فیلترهای آمیکون (Amicon) نیم میلی‌لیتری که داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری تعبیه‌شده بودند، استفاده شد. برای این کار نمونه‌ها با دور g۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس جهت تخلیه نمونه تغلیظ شده داخل فیلتر، داخل میکروتیوب جدید به‌صورت برعکس قرار داده شد و با دور g۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

نمونه‌های تغلیظ شده پس از انجماد سریع (Snap freezing) درون نیتروژن مایع، در فریزر ۷۰- نگهداری شد. هر بار قبل از بارگذاری نمونه‌ها و بین دو نمونه و در پایان کار متناسب با حجم شستشو، ستون‌ها شستشو داده شد. مراحل کلی جداسازی EVs در شکل ۱ آمده است.

شکل ۱) پروتکل جداسازی EVs از نمونه خون انسانی. پس از جداسازی پلاسما از خون، ابتدا EVs بزرگ با یک مرحله سانتریفیوژ جداسازی می‌شوند. سپس سوپ رویی از ستون‌های کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه عبور داده‌شده و فرکشن‌هایی از ستون که حاوی EVs هستند جداشده و باهم مخلوط می‌شوند. به‌منظور کاهش حجم و افزایش غلظت EVs، همه فرکشن‌های مخلوط شده تغلیظ می‌شوند و در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

روش‌های شناسایی EVs

- **پراکندگی نور پویا (DLS).** توزیع اندازه EVs با استفاده از روش پراکندگی نور پویا (Dynamic light scattering - DLS) اندازه‌گیری شد. مقدار ۵۰ میکروگرم از EVs در ۹۵۰ میکروگرم PBS رقیق شد و توزیع اندازه EVs با دستگاه Zetasizer nano در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ضریب شکست ۱/۳۸ و جذب ۰/۰۱ قرائت شد.
- **کمی سازی وزیکول‌های خارج سلولی بر اساس غلظت نسبی پروتئین (BCA assay).** به‌منظور کمی سازی EVs محتوای پروتئینی EVs جمع‌آوری‌شده با استفاده از کیت BCA Protein Assay کمی سازی شد. تست BCA روشی برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین است. اصول این تست بدین‌صورت است که پروتئین می‌تواند در یک محیط قلیایی cu2+ را به cu+ احیا کند (واکنش بیوره) و در حضور bicinchoninic Acid منجر به تولید رنگ ارغوانی شود رنگ ارغوانی حاصل از کمپلکس BCA.cu+ در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر دارای جذب است. با استفاده از یک گراف استاندارد که

www.SID.ir

Archive of SID

هم‌زمان با آزمایش تهیه شد با توجه به میزان جذب قرائت‌شده مقدار پروتئین گزارش شد.

- **وسترن بلات**. درمجموع ۲۰ میکروگرم پروتئین EVs با حجم مساوی از بافر بارگذاری نمونه SDS-PAGE رقیق و سونیکیت شد و در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس نمونه بر روی ژل ۱۲ درصد، SDS-PAGE بارگذاری گردید. پس از انتقال به غشای الکتروفورتیک (poly vinyl difluoridene- PVDF، Bio-Rad-Millipore, Germany) نمونه‌ها با آلبومین سرم گاوی ۵% (BSA ، سیگما ، ایالات متحده آمریکا) در محلول نمکی بافر تریس حاوی ۰/۱ % (TBST) Tween 20 مسدود شدند.

آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای TSG101 (۱:۵۰۰ Gentex, USA) و CD81(۱:۵۰۰ Santa Cruz, Germany) و نشانگر منفی کالنکسین (calnexin) (۱:۵۰۰ Santa Cruz, Germany,) با غشاها انکوبه شدند. در مرحله بعد لکه‌ها شسته و با آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از ۳ بار شستشو با (1X) TBST، ماده شیمیایی تقویت شده (enhanced chemiluminescence - ECL) به لکه‌ها اضافه شد و باندهای پروتئینی توسط دستگاه کمی لومینسانس تشخیص داده شدند.

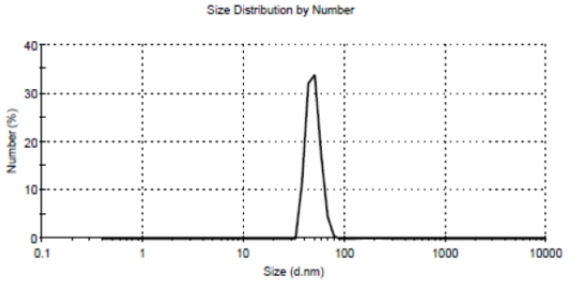
یافته‌ها

جداسازی و ارزیابی EVs حاصل از نمونه پلاسما. پس از تهیه پلاسمای خون، جداسازی EVs با استفاده از ستون‌های qEV original انجام شد و سپس مطابق با MISEV guideline موردبررسی قرار گرفت.

ازآنجایی‌که حجم دورریز ستون به‌اندازه ۲/۸ میلی‌لیتر است، پس از ۶ فراکشن نیم میلی‌لیتری، ۴ فراکشن بعدی (۷ تا ۱۰) به‌عنوان نمونه‌های حاوی EVs لحاظ شد. هر فرکشن ازنظر محتوای کمی پروتئین کل، حضور مارکرهای مولکولی وزیکولی و سلولی، و اندازه ذرات موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده مبین حضور حداکثری EVs در فرکشن‌های ۷ تا ۱۰ (F7 ,F8,F9 F10) بودند. از F11 به بعد مطابق با الگوی مشاهده‌شده در وسترن بلات، حضور کالنکسین به‌عنوان یک مارکر سلولی بیانگر وجود آلودگی‌های سلولی بود. در مقابل، F7 تا F10 فاقد این نوع از آلودگی‌ها بود. بر طبق روش BCA، پروتئینی در F7 و F8 مشاهده نشد. با توجه به اطلاعات حاصل از فرکشن‌ها، فرکشن‌های ۷ تا ۹ و فرکشن‌های ۸ تا ۱۰ به جهت تغلیظ و غنای نمونه‌ها به منظور بررسی‌های بیشتر با یکدیگر تجمیع شدند. غلظت پروتئین در فرکشن‌های تجمیع شده کمتر از ۱ mg pr/ml بود.

شناسایی EVs

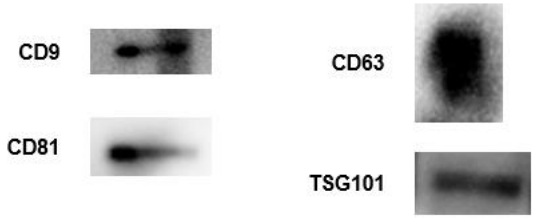
- **پراکندگی نور پویا (DLS)**. توزیع اندازه EVs جداشده با استفاده از روش پراکندگی نور پویا (DLS) بررسی شد. این تکنیک مبتنی بر اندازه‌گیری حرکت براونی مرتبط با قطر هیدرودینامیک بر پایه معادله Stokes-Einstein است. اندازه EVs جداشده از نمونه‌های مختلف بیولوژیک در محدوده ۳۰ تا ۵۰۰ نانومتر است. معمولاً EVs با اندازه زیر ۱۵۰ نانومتر را EVs کوچک اندازه می‌نامند. مطابق با شکل ۲ نتایج حاصل از این روش نشان داد که میانگین قطر EVs جداشده از پلاسما در محدوده زیر ۱۰۰نانومتر قرار داشتند.



شکل ۲) اندازه‌گیری پراکنش اندازه ذرات با DLS نشان داد که پراکنش اندازه ذرات EVs جداسازی شده از خون در محدود ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر است.

- **وسترن بلات**. پس از تعیین غلظت پروتئین کل با استفاده از روش Bicinchoninic Acid، بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE انجام شد و درنهایت به غشای الکتروفورتیک (PVDF) منتقل شد.

آنتی‌بادی‌های اختصاصی به‌کاررفته جهت ارزیابی مارکرهای مولکولی EVs شامل CD81 CD9, CD63,TSG101 بود و به‌منظور ارزیابی مارکر سلولی نشانگر منفی کالنکسین (calnexin) بود. مطابق شکل ۳ حضور مارکرهای CD9, CD63, TSG101, CD81 در همه نمونه‌های تجمیع شده، تأیید گردید. فرکشن‌های F7 تا F9 فاقد کالنکسین بودند.



شکل ۳) بررسی بیان پروتئین‌های شاخص EVs با روش وسترن بلات. EVs جداسازی شده در این پژوهش برای سه شاخص غشایی CD63، CD81 و CD9 و یک شاخص لومنال TSG101 مثبت بودند.

بحث

مطالعه تجربی حاضر بیانگر این مطلب است که تلفیق روش‌های سانتریفیوژ دور بالا و کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه به‌منظور جداسازی EVs از پلاسمای خون افراد روشی نسبتاً سریع و بسیار کارآمد است. EVs، وزیکول‌هایی در ابعاد نانو تا میکرو هستند که محتویاتی شامل لیپیدها، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های مربوطه، پروتئازها، مولکول‌های پیام‌رسان، و نیز mRNAها و non-coding RNA، ... را از سلول منشأ به سلول‌های هدف حمل می‌کنند [۸]. EVs از همه انواع سلول‌ها آزاد می‌شوند [۳] و احتمالاً توسط مکانیسم‌های دخیل در سرطان، تحریکات محیطی، فعال‌سازی سلولی، استرس اکسیداتیو، و ... القا می‌شوند.

مطالعات انجام‌شده، سازوکارهای مولکولی و میانجی‌های ارتباط بین سلولی مبتنی بر EVs در شرایط فیزیولوژیک و بیماری را بر پایه این داده‌ها به‌عنوان یک منبع احتمالی برای تحلیل

www.SID.ir

Archive of SID

فرایندهای فیزیولوژیک ارائه کرده‌اند. از طرف دیگر در طیف وسیعی از بیماری‌ها، از آن‌ها به‌عنوان اهداف درمانی و راهکار تشخیصی در جهت شناسایی بیومارکرهای ویژه استفاده می‌شود [۲۰]. ازجمله اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های ساقه‌ای مزانشیمی (Mesenchymal stem cell-derived Extracellular MSC-Derived-vesicles) که به‌طور انبوه توسط سلول‌های MSC تولید می‌شوند، قابلیت بارگذاری دارو و تحویل آن به اهداف درون‌سلولی رادارند [۲۷] یا اینکه گزوزوم‌های مهندسی‌شده به نام ای‌اگزوم (iexosome) به‌جای لیپوزوم‌ها جهت تحویل RNAهای کوتاه سنجاق‌سری اختصاصی ژن KRAS انکوژنیک در سلول‌های سرطانی پانکراس موش استفاده‌شده‌اند [۲۸]. همچنین در مطالعه دیگری از میکرو وزیکول‌های جداسازی شده از سلول‌های سرطانی LNCaP و PC-3 پروستات برای بارگذاری داروی پاکلیتاکسل (paclitaxel) در درمان این سرطان استفاده گردیده است [۲۹].

با توجه به جوان بودن و گسترش روزافزون این زمینه علمی، یکی از مشکلات، عدم استانداردسازی روش‌های جداسازی فعلی است. این روش‌ها شامل جداسازی بر مبنای استفاده از اولتراسانتریفیوژ، رسوب‌دهی، کروماتوگرافی، فیلتراسیون و روش‌های جدیدتری از قبیل میکروفلوییدیک هستند که هرکدام از آن‌ها مزایا و معایبی دارند [۳۰]. ازجمله معایب روش‌های قراردادی می‌توان به جداسازی هم‌زمان آلودگی‌ها (Co-isolation of contaminants) اشاره کرد. این‌گونه که در سانتریفیوژ افتراقی شاهد انباشت پروتئین (Protein aggregates) و در اولترا سانتریفیوژ شیب غلظتی با جداسازی ناقص وزیکول‌ها از لیپوپروتئین‌ها روبرو هستیم [۳۱]. روش اولتراسانتریفیوژ روش کلاسیک جداسازی است که بیشترین تعداد مقالات را به خود اختصاص داده است ولی زمان‌بر بودن و نیاز به دستگاه گران‌قیمت و کاربر متخصص، باعث شده است که این روش برای کارهای تشخیصی کلینیکی مناسب نباشند [۳۲]. روش qEV سریع‌ترین و مؤثرترین سیستم جداسازی EVs را فراهم می‌سازد. در این روش که بر مبنای کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه است، تهیه نمونه به میزان قابل‌توجهی خالص‌تر از روش‌های مبتنی بر غلظت مانند اولتراسانتریفیوژ و کیت‌های معرف رسوب‌دهی (precipitation reagent kits) است. روش اولتراسانتریفیوژ به‌خودی‌خود فاقد قابلیت استانداردسازی است. کیت‌های معرف رسوب‌دهی، به‌منظور تخلیص EVs به دلیل رسوب‌دهی بسیاری از پروتئین‌ها و سایر اجزای زیستی، نمونه‌های نهایی را با آلاینده‌های غیر EVs همراه می‌سازد و لذا کارآمد نخواهد بود. در مقابل نمونه‌های خالص‌شده با استفاده از روش qEV، نمونه‌های کاملاً خالص (clean)، استاندارد پذیر، و سازگار بوده که EVs در آن نه‌تنها ازنظر ساختار، بلکه از حیث عملکرد نیز دستخوش تغییر نشده و لذا جهت به‌کارگیری در حوزه‌های تحقیقاتی و آزمایش‌های بالینی قابل‌قبول هستند.

پژوهش حاضر نشان داد که با استفاده از تکنیک تلفیقی کرماتوگرافی مبتنی بر اندازه و سانتریفیوژ دور بالا، EVs از پلاسمای خون، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مایعات خارج سلولی، مطابق با حداقل دستورالعمل‌های مطالعه وزیکول‌های سلولی مایسیو [۲۶] جدا شدند. به‌منظور تأیید جداسازی، دستورالعمل‌های مایسیو تصریح می‌کند که حداقل یک نوع پروتئین در دو گروه باید مثبت شناسایی شود و از طرف دیگر عدم وجود یک نشانگر منفی باید نشان داده شود. در مطالعه حاضر، جداسازی صحیح و قابل‌اطمینان EVs از نمونه خون انسان با معیارهای MISEV2018 تأیید گردید. پراکنش اندازه وزیکول‌های جداسازی شده که در این پژوهش توسط DLS ارائه‌شده است (شکل ۲) در محدوده گزارش‌شده در دستورالعمل مایسیو قرار دارد. این وزیکول‌ها طبق نتایج وسترن بلات برای سه پروتئین غشایی تتراسپنین CD63، CD81 و CD9 و پروتئین لومنال TSG101 مثبت بودند و برای پروتئین کلنکسین به عنوان مارکر اندامک درون‌سلولی منفی بودند (شکل ۳). در این پژوهش روش مورداستفاده جهت جداسازی EVs از پلاسمای خون با مشخص کردن EVs با روش‌های کیفی و کمی (از طریق تأیید حضور نشانگرهای EVs و عدم حضور شاخص‌های منفی)، بر معیارهای دستورالعمل مایسیو انطباق داشت، لذا توانایی جداسازی موفقیت‌آمیز EVs از خون به‌عنوان یک مایع مهم دینامیک خارج سلولی، امکان جداسازی miRNA، پروتئومیکس، متابولومیکس، و نیز تحقق انجام دیگر سنجش‌های کابردی را فراهم می‌سازد.

یکی دیگر از مزایای این روش، سرعت نسبتاً بالای آن است که در کمتر از یک ساعت قابلیت انجام دارد. از طرف دیگر، این روش قابلیت انجام در هر محیط آزمایشگاهی بدون تجهیزات خیلی پیشرفته از قبیل اولتراسانتریفیوژ را دارد و در آینده می‌تواند در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به کار گرفته شود.

لازم به ذکر است که در برخی مشاغل به‌واسطه پرخطر و استرس‌زا بودن، رصد و پایش مداوم سلامت افراد، امری ضروری است. از این مشاغل پراسترس و پرمخاطره می‌توان به نظامی‌گری ازجمله یگان ویژه، نیروهای عملیاتی و... اشاره کرد که احتمال ابتلای کارکنان به امراض روان‌تنی، عضلانی و اسکلتی و قلبی-عروقی زیاد است، لذا ضرورت دستیابی به یک روش سریع و با دقت بالا جهت پایش سلامتی دوره‌ای این افراد اهمیت فراوانی دارد. از طرفی حساسیت و گستردگی معاینات سربازان و دیگر افراد نظامی، بر ضرورت در اختیار داشتن شیوه‌ای باقابلیت انجام در انواع محیط‌های آزمایشگاهی نظامی و انتظامی و با امکانات حداقلی می‌افزاید.

نتیجه‌گیری

طبق یافته‌های مطالعه حاضر تلفیق روش‌های سانتریفیوژ دور بالا و کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه به‌منظور جداسازی EVs از پلاسمای خون افراد روشی نسبتاً سریع و بسیار کارآمد است. EVs علاوه بر پتانسیل‌های درمانی بالایی که دارند، با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فردی که درزمینهٔ محتوی درون‌سلولی دارند، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی جهت پایش سلامت فرد بهره برد. زیرا EVs اطلاعات حاصل از سلول‌های اجدادی را حمل می‌نمایند، بنابراین با آنالیز آن‌ها در نمونه‌های مختلف زیستی بدن ازجمله بزاق، خون و ... می‌توان وضعیت سلامت افراد بخصوص افرادی که دارای مشاغل پراسترس هستند را در کمترین زمان ممکن رصد نمود و از این روش به‌عنوان یک پلت فرم تشخیصی جهت پیش‌بینی شرایط سلامتی و بروز بیماری‌های احتمالی فرد بهره برد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل یک پروژه تحقیقاتی است و در موسسه زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان انجام‌شده است. نویسندگان این مقاله از همکاری مسئولین ذی‌ربط موسسه رویان

www.SID.ir

Archive of SID

که در انجام این طرح تحقیقاتی کمک نموده‌اند، تشکر و تقدیر می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

References

1. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. Journal of Cell Biology. 2013 Feb 18;200(4):373-83.
2. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2761-6.
3. Breakefield XO, Frederickson RM, Simpson RJ. Gesicles: microvesicle "cookies" for transient information transfer between cells. Molecular Therapy. 2011 Sep 1;19(9):1574-6.
4. Ban LA, Shackel NA, McLennan SV. Extracellular vesicles: a new frontier in biomarker discovery for non-alcoholic fatty liver disease. International journal of molecular sciences. 2016 Mar;17(3):376.
5. Kalamvoki M, Deschamps T. Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. Virology journal. 2016 Dec;13(1):1-2.
6. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. The Journal of clinical investigation. 2016 Apr 1;126(4):1152-62.
7. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of extracellular vesicles. 2015 Jan 1;4(1):27066.
8. Ramis JM. extracellular Vesicles in cell Biology and Medicine. 2020.
9. Dozio V, Sanchez JC. Characterisation of extracellular vesicle-subsets derived from brain endothelial cells and analysis of their protein cargo modulation after TNF exposure. Journal of extracellular vesicles. 2017 Dec 1;6(1):1302705.
10. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Frontiers in immunology. 2014 Sep 16;5:442.
11. Kuriyama N, Yoshioka Y, Kikuchi S, Azuma N, Ochiya T. Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Tumor Neovasculature. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020 Dec 9;8:1510.
12. Treps L, Edmond S, Harford-Wright E, Galan-Moya EM, Schmitt A, Azzi S, Citerne A, Bidere N, Ricard D, Gavard J. Extracellular vesicle-transported Semaphorin3A promotes vascular permeability in glioblastoma. Oncogene. 2016 May;35(20):2615-23.
13. Shelke GV, Yin Y, Jang SC, Lässer C, Wennmalm S, Hoffmann HJ, Li L, Gho YS, Nilsson JA, Lötvall J. Endosomal signalling via exosome surface TGFβ-1. Journal of extracellular vesicles. 2019 Dec 1;8(1):1650458.
14. Ortega FG, Piguillem SV, Messina GA, Tortella GR, Rubilar O, Castillo MI, Lorente JA, Serrano MJ, Raba J, Baldo MA. EGFR detection in extracellular vesicles of breast cancer patients through immunosensor based on silica-chitosan nanoplatform. Talanta. 2019 Mar 1;194:243-52.
15. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. Journal of lipid research. 2010 Aug 1;51(8):2105-20.
16. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. Progress in lipid research. 2017 Apr 1;66:30-41.
17. Momen-Heravi F, Getting SJ, Moschos SA. Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery. Pharmacology & therapeutics. 2018 Dec 1;192:170-87.
18. Sork H, Corso G, Krjutskov K, Johansson HJ, Nordin JZ, Wiklander OP, Lee YX, Westholm JO, Lehtiö J, Wood MJ, Mäger I. Heterogeneity and interplay of the extracellular vesicle small RNA transcriptome and proteome. Scientific reports. 2018 Jul 17;8(1):1-2.
19. Kaur S, Abu-Shahba AG, Paananen RO, Hongisto H, Hiidenmaa H, Skottman H, Seppänen-Kaijansinkko R, Mannerström B. Small non-coding RNA landscape of extracellular vesicles from human stem cells. Scientific reports. 2018 Oct 19;8(1):1-8.
20. Santiago-Dieppa DR, Steinberg J, Gonda D, Cheung VJ, Carter BS, Chen CC. Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy'in glioblastoma patients. Expert review of molecular diagnostics. 2014 Sep 1;14(7):819-25.
21. Hu T, Wolfram J, Srivastava S. Extracellular vesicles in cancer detection: hopes and hypes. Trends in Cancer. 2020 Sep 30.
22. Xu K, Liu Q, Wu K, Liu L, Zhao M, Yang H, Wang X, Wang W. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases. Journal of translational medicine. 2020 Dec;18(1):1-8.
23. Sluijter JP, Davidson SM, Boulanger CM, Buzas EI, De Kleijn DP, Engel FB, Giricz Z, Hausenloy DJ, Kishore R, Lecour S, Leor J. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. Cardiovascular research. 2018 Jan 1;114(1):19-34.
24. Kubo H. Extracellular vesicles in lung disease. Chest. 2018 Jan 1;153(1):210-6.
25. Raimondo S, Corrado C, Raimondi L, De Leo G, Alessandro R. Role of extracellular vesicles in hematological malignancies. BioMed research international. 2015 Oct 25;2015.
26. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014

www.SID.ir

Archive of SID

guidelines. Journal of extracellular vesicles. 2018 Dec;7(1):1535750.
27. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, Lim SK. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. Advanced drug delivery reviews. 2013 Mar 1;65(3):336-41.
28. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Nature. 2017 Jun;546(7659):498-503.
29. Saari H, Lázaro-Ibáñez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. Journal of controlled release. 2015 Dec 28;220:727-37.
30. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. Journal of extracellular vesicles. 2013 Jan 1;2(1):20360.
31. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, Richardson C, Mc Gee MM. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. Scientific reports. 2020 Jan 23;10(1):1-3.
32. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed research international. 2018 Oct;2018.

www.SID.ir