Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.41; No.4; 2018

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

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

Shahrzad Nojehdehi[1], Seyed Mahmoud Hashemi[2*], Ardeshir Hesampour[3]

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

Backgrond*: 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: smmhashemi@sbmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۹۶، صفحات ۲۴۴ تا ۲۵۰

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

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 ایمونولوژی، 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 سال‌های اخیر عملکردهای سلول‌های بنیادی مزانشیم در مرکز توجه قرار گرفته است. شواهد نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی مزانشیم به شیوه‌ای پاراکرین عمل می‌کنند؛ بنابراین، عوامل بیولوژیکی از جمله اگزوزوم ها و عوامل محلول در آب، در محیط کشت سلول‌ها وجود دارند که می‌توانند عملکردی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیم داشته باشند. بنابراین جداسازی اگزوزوم ها از سلول‌های بنیادی مزانشیم و تعیین خصوصیت آن‌ها و تأییدشان می‌تواند جهت پیشبرد اهداف درمانی در بیماری‌هایی همانند بیماری‌های خود ایمن و سرطان مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از اگزوزوم های جداشده از سوپ و مایع رویی کشت سلول‌های 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، سلول‌های بنیادی مزانشیم استخراج شده است و پس از تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیم، از سوپ سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش سانتریفیوژ تفریقی اگزوزوم ها جداسازی گردید. غلظت اگزوزوم ها با روش بردفورد تعیین و همچنین خصوصیات کیفی آن‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی و دستگاه تفریقی نور تعیین شد.*

یافته‌ها: *بعد از کشت و پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیم، سوپ سلولی بعد از ۴۸ ساعت جمع‌آوری شده و با استفاده از سانتریفیوژ تفریقی با دور ۶۰۰۰۰g اگزوزوم های آن با اندازه‌ی تقریباً ۴۰ تا ۱۰۰ نانو متر جدا گردید. میانگین غلظت آن ۶۳۰ mg/ml بوده و در تصاویر میکروسکوپ الکترونی تمامیت غشا اگزوزوم هاطی فرایند جداسازی حفظ شده است و ساختار کروی دچار آسیب نشده است. نتایج آنالیز دستگاه تفریقی نور نشان می‌دهد که تقریباً ۷۰ درصد ذرات دارای میانگین قطر ۹۰-۵۰ نانو متر و هستند.*

نتیجه‌گیری: *در مقایسه دو روش جداسازی ۱۰۰۰۰۰g و ۶۰۰۰۰g در نتایج به دست آمده در پژوهش‌های دیگر ذرات اگزوزوم در دور ۱۰۰۰۰g خالصتر می‌باشند ولی در دور ۶۰۰۰۰g ممکن است ذرات بزرگ‌تری از اگزوزوم مانند میکروویزیکول ها دیده شوند ولی در نهایت به علت دسترسی کمتر به اولترا سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰۰g ، جداسازی با دور پایین‌تر هم کاربردی می‌باشد.همچنین جداسازی اگزوزوم های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیم و تولید انبوه آن احتمالاً می‌تواند به عنوان یک محصول زیست ایمن در درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: *اگزوزوم، سلول‌های بنیادی مزانشیم، جداسازی، اولتراسانتریفیوژ*

* **نویسنده مسئول:** دکتر سید محمود هاشمی
پست الکترونیک: *smmhashemi@sbmu.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

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 ارگان ها مانند مغز استخوان، بافت چربی و... جداشده‌اند. سلول‌های بنیادی بافت چربی با سرکوب استرس اکسیداتیو و التهاب، آسیب بافتی را کاهش می‌دهند (۱). اگزوزوم ها 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 اگزوزوم ها خطراتی نظیر آنوپلوئیدی و رد پیوند را ندارند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای درمان انواع بیماری‌ها باشند (۲).

اگزوزم ها وزیکول های 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. اگزوزوم ها حاوی مقدار قابل‌توجهی از مولکول‌های RNA و پروتئین‌ها می‌باشند. همچنین اگزوزوم ها می‌توانند به منظور بررسی روند درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان‌ها نقش ایفا کنند. علاوه بر این ممکن است اگزوزوم ها به بهبود درمان‌های فردی یا خوددرمانی (مانند تزریق انسولین) استفاده شوند (۳).

هدف از این مطالعه جداسازی اگزوزوم های 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 اگزوزوم ها 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 اگزوزوم های مشتق از سلول بنیادی در ایمنی درمانی سرطان و کاربردهای آینده آن‌ها در درمان‌های بدون سلول در طب آینده مورد بحث قرار خواهد گرفت (4). 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 داده‌شده که اگزوزوم ها و میکرو وزیکول‌ها همانند سلول‌های مولد خود دارای آثار ایمونومودولاتوری و ایمونوساپرسوری هستند؛ مثلاً اگر میکرو وزیکول‌ها و اگزوزوم ها را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و یا سلول‌های ایمنی جداسازی کنیم دارای خواص سلول اولیه خواهند بود (۵). اگزوزوم ها شامل یک مجموعه لیگاند رسپتور، 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 مهاری، برنامه‌ریزی مجدد ژنتیکی و تغییر فنوتیپی در سلول‌های هدف می‌شوند (۶). روش‌های مورد استفاده در جداسازی اگزوزوم ها 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 کشته‌شده و بافت چربی ناحیه شکمی در شرایط استریل جداشده و پس از شستشو با PBSمحلولی نمکی بافر شده فسفات *(PBS یا Posphate buffered saline) استریل که حاوی ۲۵ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و خرد کردن به وسیله تیغ جراحی با استفاده از کلاژناز نوع یک (سیگما) با غلظت ۰/۱گرم درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته شده تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۵۰۰ سلول‌های چربی از سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند. سپس رسوب به همراه ه محیط کشت کامل DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS یا FEetal 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 (nM100)، 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 (nM250)، 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 آلیزارین رد برای تأیید رده استخوانی و برای تأیید تشکیل واکوئل های چربی از رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد (۱۰).

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

برای جداسازی اگزوزوم ها، 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 اگزوزوم ها از محیط کشت رویی سلول‌های مزانشیمی حذف سلول‌های مرده و سلول‌های دارای دبری می‌باشد. سوپ‌های جمع‌آوری شده به مدت

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

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 ۲۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید. مجدد سوپ بالایی نگه‌داری شد و پلت سلولی خارج و اوت گردید. در آخر به مدت ۹۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ (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 اگزوزوم ها 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 (۱۱).

تعیین خصوصیات اگزوزوم های جداشده از سلول‌های بنیادی مزانشیم:

۱- عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی:

برای مشاهده مورفولوژی اگزوزوم ها 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 سانتریفیوژ، با استفاده از پارافرمالدهید 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-microsc) با ولتاژ انتخابی Kv۳۰،گرفته شد (۱۰).

به منظور آماده سازی برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، در ابتدا سوسپانسیون اگزوزوم با استفاده از گلوتارالدهید 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 گرید ها 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 رنگ‌آمیزی شد. بررسی‌های مربوط به مورفولوژی و اندازه اگزوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM LEO 906(شرکت zeiss ، https://www.micro-shop.zeiss.com) در ولتاژ Kv۸۰ انجام گرفت و عکس‌ها تهیه گردید (۱۱).

۲ -تعیین غلظت اگزوزوم ها با استفاده از روش بردفورد:

به منظور تعیین مقدار اگزوزوم جداشده، 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 اگزوزوم ها با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS):

برای ردیابی اگزوزوم ها روش‌های نوینی نظیر(Immunoaffinity-based capture method یا IAC)، (Nanoparticle tracking analysis یا NTA)، (Dynamic Light Scattering یا DLS) و (Surface Plasma Resonance یا SPR) برای این منظور استفاده می‌شود (۱۱) که در این تحقیق برای تعیین اندازه قطر اگزوزوم ها با تکنیک DLS با استفاده از دستگاه زتا سایزر 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 می رود. ما در این جا به منظور آماده سازی اگزوزوم ها 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 رنگ‌آمیزی با Oil Red دیده شدند شکل ۱ (B). همچنین با استفاده از محیط استئوژنیک، به مدت ۲۱ روز و سپس رنگ‌آمیزی با Alizarin Red رسوبات کلسیم به صورت نواحی قرمز رنگ به خوبی قابل مشاهده است شکل ۱ (C).

بررسی اگزوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی:

تأیید کیفیت و ساختار اگزوزوم ها با تکنیک TEM:

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

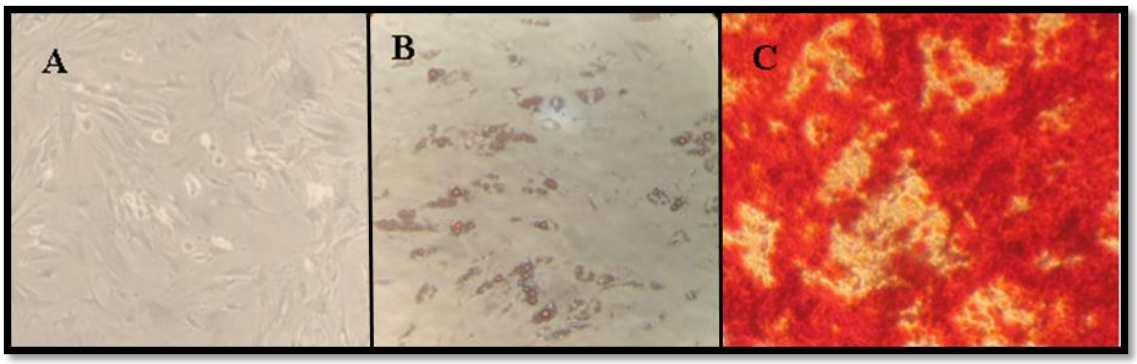
با استفاده از محلول Bradford و تهیه رقت‌های متوالی از پروتئین BSA که غلظت آن مشخص بود منحنی استاندارد تعیین غلظت پروتئین به دست آمد. با استفاده از فرمول خط نمودار فوق مقادیر غلظت پروتئین اگزوزوم جداشده محاسبه گردیده است که مقدار آن ۶۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. هدف از انجام این تست تعیین وجود پروتئین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

نتایج به دست آمده از آنالیز DLS:

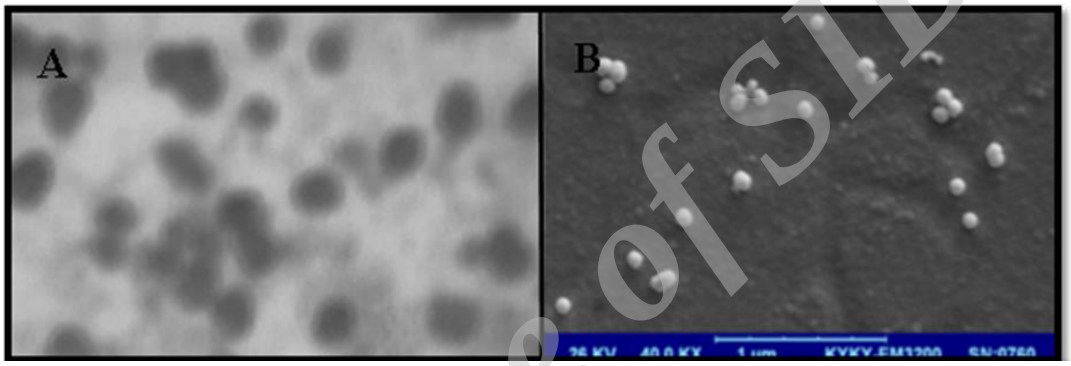
با استفاده از دستگاه MALVERN.با استفاده از تکنیک DLS قطر ذرات موجود در سوسپانسیون اگزوزوم جداشده از سلول‌ها تعیین گردید. همان طور که در شکل ۵ آمده تقریباً ۷۷ درصد ذرات دارای میانگین قطر بین ۷۹

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018



شکل ۱ (A): سلول‌های بنیادی مزانشیم در پاساژ دوم به شکل دوکی و شبه فیبروبلاست دیده می‌شوند. (B): تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی رنگ‌آمیزی اویل رد. (C): رنگ‌آمیزی آلیزارین رد جهت مشاهده سلول‌های تمایز یافته به بافت استخوانی.



شکل ۲ (A) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم با تکنیک TEM(رنگ‌آمیزی 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 نانو متر تأیید شده است وهمچنین کروی بودن آن ها در تصویر دیده می شود.

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

بحث:

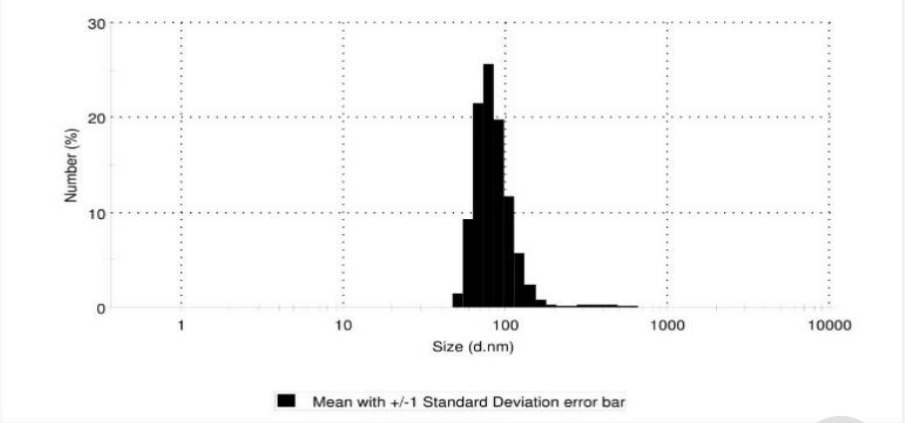
تفاوت در روش‌های جداسازی اگزوزوم ها بر این اساس است که کدام روش موثرترین توانایی را برای جداسازی اگزوزوم ها دارد. همچنین حذف پارتیکل های اضافی و کنستانتره های پروتئین هم در روش‌های استاندارد جداسازی مورد توجه می‌باشد (۱۴). در پژوهش های انجام‌شده، دو روش اولترا سانتریفیوژ را با روش سانتریفیوژ شیب چگالی مقایسه کرده‌اند که نتایج به دست آمده از مقایسه این دو روش نشان می‌دهد که سانتریفیوژ شیب چگالی روشی موثر تری می‌باشد در صورتی که اولترا سانترفیوژ روش ارزان تری محسوب می‌شود (۱۵). بر اساس خواص ایمونوفاینیتی و تعامل آنتی ژن و آنتی بادی، تکنیک های IAC و SPR به منظور حساسیت بیشتر پیشنهاد می‌شوند. با توجه مسائل مربوط به هزینه، AF4، NTA و DLS نسبتاً مقرون به صرفه‌تر هستند (۱۶). ولی ارزان‌ترین روش که زمان کمتری هم نیاز دارد DLS می‌باشد (۱۱).

در این پژوهش ما توانستیم با استفاده از اولترا سانتریفیوژ با دور ۶۰,۰۰۰ g اگزوزم های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موجود در سوپ سلولی را جداسازی کرده و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی خصوصیات آن‌ها را تعیین نماییم. همچنین با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) تقریباً ۷۰ درصد میکروووزیکول های جداشده با روش اولترا سانترفیوژ تقریباً ۷۷ درصد ذرات دارای میانگین قطر بین ۷۹ نانو متر هستند. همچنین در مقایسه دو روش جداسازی ۱۰۰۰۰۰ g و ۶۰۰۰۰g در نتایج بدست آمده در پژوهش های دیگر ذرات اگزوزوم در دور۱۰۰۰۰ g (روش thery و همکاران) خالص تر می باشند ولی در دور ۶۰۰۰۰ g ممکن است ذرات بزرگتری از اگزوزوم مانند میکروووزیکول ها دیده شوند. به طور کلی روش جداسازی اگزوزوم ها با استفاده از ستون های ایمونوافینی 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 سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای آثار ایمونومودولاتوری هستند کاندید مناسبی برای ایمونوتراپی بیماری‌های اتوایمیون هستند. در

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018



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

شرایط طبیعی و پاتولوژیک سلول‌های بدن از غشا خود وزیکول‌هایی با نام میکرو وزیکول‌ها و اگزوزوم ها آزاد می‌کنند که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرارگرفته است. این وزیکول‌ها محتوی ترکیبات پروتئینی و گلیکو پروتئینی و فسفولیپیدی غشا ازجمله رسپتور ها و مولکول‌های سطح سلول می‌باشند. همچنین بسیاری از مولکول‌های موجود در سیتوزول نیز در داخل این وزیکول‌ها موجود است؛ بنابراین با توجه به مشکلات و عوارض موجود در تزریق مستقیم سلول‌های بنیادی استفاده از میکرو وزیکول‌ها و اگزوزوم ها بجای تزریق مستقیم سلول‌های بنیادی می‌تواند به عنوان روش جایگزین سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۱۷).

در مطالعاتی که انجام‌شده، ارزیابی کارایی درمانی اگزوزوم های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیم در مهار پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های خود واکنشگر زیر رده‌های TH1,TH17 و تخفیف شدت علائم بالینی در انسفالومیلیت تجربی خود ایمن است. در این تحقیق متعاقب القا بیماری در موش‌های C57/BL6 و ظهور علائم بیماری،موش‌ها تحت تزریق اگزوزوم قرار گرفتند. داده‌ها نشان داده بودند که سلول‌های بنیادی و اگزوزوم های مشتق از آن‌ها از طریق کاهش ترشح سایتوکاین ها التهابی IL17، اینترفرون گاما، افزایش سایتوکاین های ضد التهابی TGF-βو IL-10 و مهار تکثیر آنی ژنیک در لنفوسیت‌های T خود واکنشگر قادر به تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری می‌باشند (۱۸).

همچنین در مطالعه‌ی دیگری سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) اثر حفاظت کنندگی واضحی را روی پانکراتیت حاد (AP) نشان داده‌اند. هدف از این مطالعه آنالیز اثر میکرو وزیکول های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (bmMSC-MVs) روی پانکراتیت حاد و کشف مکانیسم های دخیل بود. میکرو وزیکول های مشتق از سلول‌های 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 الفا و TNF آلفا کاهش داد و به طور دراماتیکی جابه‌جایی هسته‌ای NFκBp65 را در پانکراتیت حاد ملایم القا شده با Cerulein و پانکراتیت حاد شدید القا شده با سدیم توروکولات کاهش داد. میکرو وزیکول های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، نرخ بقای سلول‌های 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 سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با کاهش سطح سیتوکین های پیش التهابی و تنظیم جابه‌جایی هسته‌ای NFκBp65 نقش حفاظتی را در پانکراتیت حاد بازی می‌کنند. میکرو وزیکول های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌توانند به عنوان یک استراتژی برای درمان بالینی پانکراتیت حاد شدید القا شده با سدیم توروکولات استفاده شود (۱۹).

نتیجه‌گیری:

در آخر استفاده درمانی از اگزوزوم ها به عنوان یک روش درمانی غیر سلولی یکسری مزایایی دارد که می‌تواند توجیه مناسبی برای جایگزینی آن در روش‌های معمول سلول درمانی باشد. استفاده از اگزوزوم های جداشده از مایع رویی کشت سلول‌های 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 فرآورده‌های سلول‌های 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 نامه‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز می باشد. بدین وسیله از اساتید محترم جناب آقای دکتر هاشمی و جناب آقای دکتر حسام‌پور برای راهنمایی‌های بی دریغشان کمال تشکر را دارم. همچنین از مرکز تحقیقات بن یاخته صمیمانه سپاسگزاری می‌کنم.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 16:08 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

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, Wiegmans 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, Delirezh 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.

Archive of SID

www.SID.ir