DOI: 10.22122/jims.v38i562.12770 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۶۲/هفته‌ی دوم فروردین ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۱/۱۴

جداسازی و تعیین خصوصیات اگزوزوم‌های جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ و پلی‌اتیلن‌گلیکول

فتانه توسلیان[۱]، احمد زواران حسینی[۲]، سارا صعودی[۳]، محمود نادری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌توانند عملکرد مشابهی با سلول‌های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت‌های آسیب دیده و همچنین، تعدیل پاسخ‌های ایمنی داشته باشند. امروزه، این اگزوزوم‌ها، به عنوان ابزار کارآمدی در طب ترمیمی و همچنین، بیماری‌های خود ایمن و سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از بافت چربی موش جدا شدند و هویت آن‌ها تعیین گردید. از سوپ رویی سلول‌ها با استفاده از دو روش اولترا سانتریفیوژ با دور ۱۱۰۰۰۰ g و پلی‌اتیلن‌گلیکول (Polyethylene glycol یا PEG) جهت استخراج اگزوزوم استفاده شد. برای بررسی صحت اگزوزوم‌های جدا شده، از روش‌های Dynamic light scattering (DLS)، میکروسکوپ الکترونی نگاره،گذاره و آزمون Bradford استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از PEG نشان داد که بیشترین اگزوزوم‌های کروری استخراج شده در محدوده‌ی ۳۰۰–۵۰ نانومتر بودند، اما روش اولترا سانتریفیوژ محدوده‌ی ۱۰۰–۳۰ نانومتری را نشان داد. با استفاده از آزمایش Bradford، میزان غلظت اگزوزوم‌های استخراج شده با استفاده از اولترا سانتریفیوژ ۱۲۹۶/۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و میزان غلظت اگزوزوم‌های استخراج شده با استفاده از PEG ۱۳۲۲/۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر گزارش شد.

نتیجه‌گیری: در مقایسه‌ی دو روش جداسازی اگزوزوم‌ها، نتایج نشان داد که ذرات استخراج شده با روش اولترا سانتریفیوژ دارای خلوص بیشتری می‌باشند، اما در روش PEG، به علت رسوب PEG بر روی ذرات، اگزوزوم‌ها دارای ابعاد بزرگ‌تر و خلوص کمتری می‌باشند، اما در نهایت، به علت دسترسی کمتر به اولترا سانتریفیوژ با دور بالا، جداسازی به روش PEG نیز کاربردی است.

واژگان کلیدی: اگزوزوم؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ اولترا سانتریفیوژ؛ پلی‌اتیلن‌گلیکول

ارجاع: توسلیان فتانه، زواران حسینی احمد، صعودی سارا، نادری محمود. **جداسازی و تعیین خصوصیات اگزوزوم‌های جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیم با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ و پلی‌اتیلن‌گلیکول.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۶۲): ۳۸-۳۱

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی پرتوان می‌باشند که در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها، قابلیت خودنوزایی و تمایز به انواع مختلف سلول های استرومایی را دارند. این سلول‌ها، به واسطه‌ی اتصال مستقیم سلول- سلول و همچنین، به شیوه‌های پاراکرین عمل می‌کنند و با ترشح عوامل مختلف رشد و سیتوکاین ها، نقش بسیار مهمی در هموستاز بافتی، خون‌سازی و تعدیل پاسخ های ایمنی دارند. وزیکول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نظیر اگزوزوم‌ها، می‌توانند عملکردی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیم داشته باشند. این اگزوزوم‌ها، محتوی RNA، پروتئین و میکروRNAهای متعددی هستند که تحت شرایط مختلف فیزیولوژیک و یا پاتولوژیک تولید و ترشح می‌شوند. در واقع، اگزوزوم‌ها دسته‌ای از وزیکول‌های کوچک ترشحی با منشأ اندوزومی هستند که توسط بسیاری از انواع سلول ها نظیر سلول های بنیادی

۱- دانشجوی دکتری ،گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: احمد زواران حسینی؛ استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: zavarana@modares.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مزانشیمی ترشح می‌شوند (۱).

اگزوزوم‌ها را می‌توان ذراتی کروی شکل با دو لایه‌ی لیپیدی نامید که اندازه‌ای ۱۵۰-۳۰ نانومتر و تراکم شناور ۱/۲۱-۱/۱ گرم/میلی‌لیتر در گرادیانت سوکروز دارند (۲). اگزوزم‌ها، همچنین دارای پروتئین‌های نشانگری در سطح هستند که نشان دهنده‌ی منشأ اندوزومی آن‌ها می‌باشد (۳). اگزوزوم‌ها، دارای نقش‌های متعددی می‌باشند که از مهم‌ترین آن‌ها، می‌توان به برقراری ارتباطات سلول- سلول در فواصل نزدیک (اطراف سلول‌ها) و فواصل دور در بدن اشاره کرد (۴) .در دهه‌ی گذشته، علاقمندی‌های زیادی در زمینه‌ی مطالعه‌ی عملکرد اگزوزوم‌ها ایجاد شده است و مطالعات زیادی اشاره به این نکته دارند که اگزوزوم‌ها به عنوان ابزارهای مهم ارتباطات سلول- سلول در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند، عمل می‌نمایند (۵). وقایعی نظیر دفع پروتئین‌های زاید، عرضه‌ی آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی، رگزایی، التهاب، متاستاز، گسترش پاتوژن‌ها و بسیاری از فعالیت‌های دیگر، از جمله نقش‌های این وزیکول‌ها بسته به محتوای آن‌ها در بدن می‌باشند (۶).

برای مطالعه‌ی اگزووم‌ها و استفاده‌ی کاربردی از آن‌ها، ابتدا باید این ذرات از سایر وزیکول‌ها و ترکیبات سلول جدا و خالص شوند؛ به همین منظور، روش‌های مختلفی طراحی شده است (۷). مهم‌ترین و پرکاربردترین روش برای جدا کردن اگزوزوم‌ها، اولترا سانتریفیوژ افتراقی است که شامل یک سری از دورهای سانتریفیوژ با زمان‌های متفاوت برای رسوب ترکیبات مختلف سلولی است و در انتها، اولترا سانتریفیوژ با دور بالا، موجب رسوب اگزوزوم‌ها می‌شود (۸). روش دیگر، بر اساس پلی‌اتیلن‌گلیکول (Polyethylene glycol یا PEG) است. این ترکیب، پلیمری است که باعث محبوس کردن مولکول‌های آب می‌شود و در نتیجه، باعث می‌شود که ترکیبات با محلولیت کمتر، از محلول جدا شوند (۹). در این روش نیز نمونه با محلول حاوی PEG انکوبه می‌شود و پس از زمان انکوباسیون، رسوب حاوی اگزوزوم‌ها با فیلتراسیون یا سانتریفیوژ با دور پایین جدا می‌شود (۱۰).

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی روش‌های جداسازی و تعیین خصوصیات اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی از محیط کشت آن‌ها با استفاده از دو روش اولترا سانتریفیوژ و PEG بود.

روش‌ها

این مطالعه در کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس با شماره‌ی IR.TMU.REC.1395.394 تأیید و ثبت شده است.

بررسی شاخص های سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان بر اساس خاصیت چسبندگی آن‌ها به بستر فلاسک کشت سلول، از سایر سلول‌های موجود در بافت چربی جدا کرد. در این مطالعه، از موش‌های C57BL/6 ماده با سن ۸-۶ هفته که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، استفاده گردید. سلول‌های مزانشیمی موشی حاوی شاخص‌های سطحی CD105، CD44، CD73 و CD90 بود و عدم بروز شاخص‌های سلول‌های خون‌ساز نظیر CD45 و CD34 بر سطح این سلول‌ها گزارش شد.

جهت بررسی فلوسایتومتری شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از سلول‌های پاساژ دوم استفاده گردید. سلول‌ها تریپسینه شدند. پس از شمارش سلولی برای هر شاخص تعداد ۱۰۰ هزار سلول در میکروتیوب ریخته شد. مقدار لازم از هر آنتی‌بادی و یا ایزوتایپ شاهد مناسب آن‌ها طبق پیشنهاد شرکت سازنده (BD, Pharmigen, USA) به پلیت سلولی اضافه شد و این مخلوط، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه گردید. سپس، به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شد و رسوب سلولی حاصل پس از سوسپانسیون کردن دوباره با Phosphate buffered saline (PBS) سرد محتوی ۲ درصد Fetal bovine serum (FBS) به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ و شسته شد تا آنتی بادی های اضافه از محیط حذف گردد. سپس، سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, CA) مورد خوانش قرار گرفت و با نرم‌افزار Flowjo نسخه‌ی ۶/۳ واکاوی شد.

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استخوان و چربی: برای کشت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از پلیت‌های کشت ۶ خانه‌ای استفاده شد. برای این منظور، پس از جمع‌آوری سلول‌ها، از فلاسک اصلی کشت، تعداد ۵۰-۲۰ هزار سلول به هر خانه از پلیت کشت ۶ خانه‌ای ریخته شد و پلیت به انکوباتور منتقل گردید. پس از اینکه سلول‌ها به طور کامل کف خانه‌های پلیت را پر کردند، محیط تمایزی استخوان و چربی به حجم ۲ میلی‌لیتر به صورت جداگانه اضافه شد و تعویض محیط هر ۳-۲ روز یک بار انجام گردید. پایش سلول‌ها طی ۳-۱ هفته پس از شروع تمایز انجام شد.

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

برای جداسازی اگزوزوم‌ها، هنگامی که میزان پر شدگی سلول‌ها به ۹۰ درصد رسید، FBS از محیط کشت حذف شد و سوپ سلولی پس از ۴۸ ساعت جمع‌آوری گردید. پس از جمع‌آوری سوپ سلولی، قدم اول برای تهیه‌ی اگزوزوم‌ها از محیط کشت رویی سلول‌های مزانشیمی، حذف سلول‌های مرده و سلول‌های دارای دبری می‌باشد. سوپ‌های جمع‌آوری شده به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بار دیگر، سوپ بالایی نگهداری

و پلت سلولی خارج گردید. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با دور g ۲۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مجدد سوپ بالایی نگهداری شد و پلت سلولی خارج گردید. در آخر، به مدت ۱۲۰ دقیقه با دور g ۱۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در این مرحله، مایع رویی به آرامی خارج و پلت به وسیله‌ی ۵۰۰ میکرولیتر PBS استریل سوسپانسیون گردید.

جمع‌آوری سوپ سلولی و جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از PEG: برای جداسازی اگزوزوم‌ها، در این روش نیز مشابه روش اولترا سانتریفیوژ عمل شد. به سوپ‌های جمع‌آوری شده، ۳۰۰ میکرولیتر بافر PEG اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. در این مرحله، مایع رویی به آرامی خارج و پلت به وسیله‌ی ۵۰۰ میکرولیتر PBS استریل سوسپانسیون گردید.

بررسی اندازه‌ی اگزوزوم‌ها با دستگاه Dynamic light scattering (DLS): جهت بررسی اندازه‌ی اگزوزوم‌ها با دستگاه DLS، حدود ۸۰ میکرولیتر از محلول اگزوزومی با اضافه کردن ۴۲۰ میکرولیتر از PBS فیلتر شده به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسید. سپس، نمونه روی یخ گذاشته شد و به مدت ۲۰ دقیقه سونیکیت گردید و در انتها، نمونه در دستگاه DLS قرار داده شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Zeta Sizer واکاوی گردید.

میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning electron microscope یا SEM): ۲۰ میکروگرم از نمونه‌ی اگزوزوم روی لام ریخته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق خشک شد. سپس، نمونه با میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission electron microscope یا TEM): ۱۰ میکرولیتر از اگزوزوم رقیق شده در PBS بر روی گرید کت شده با Formvar منتقل گردید و رنگ آمیزی منفی نمونه با استفاده از ۱۰ میکرولیتر محلول آبی فسفوتنگستنیک اسید ۱ درصد خنثی انجام شد. اگزوزوم‌های کت شده بر روی گرید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره در ولتاژ ۵۰ کیلوولت بررسی شد.

تعیین غلظت اگزوزوم ها با استفاده از روش Bradford: جهت تعیین غلظت اگزوزوم‌ها، محلول Bradford تهیه شد. برای هر نمونه، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ی اگزوزومی با ۴۷۵ میکرولیتر از بافر Bradford مخلوط (Mix) گردید و برای ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شد. ابتدا، با استفاده از لوله‌ی بلانک که حاوی بافر Bradfors و آب‌مقطر (بدون Bovine serum albumin یا BSA) بود، اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر صفر گردید و سپس، جذب نوری در رقت‌های سریالی BSA خوانده شد. هر بار کووت با آب‌مقطر ۲ بار تقطیر به خوبی شسته شد. آن گاه، غلظت نمونه‌های اگزوزمی خوانده شد. جهت تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ی مجهول در نرم‌افزار Excel، منحنی استاندارد رسم گردید؛ بدین صورت که میزان جذب نوری روی خط عمودی و میزان غلظت پروتئین استاندارد روی خط افقی قرار داده شد. سپس، مقادیر خوانده شده روی منحنی، مشخص و به هم وصل شد و در انتها، با قرار دادن غلظت نمونه در معادله‌ی خط، غلظت اگزوزوم به دست آمد.

یافته‌ها

بررسی شاخص‌های سطحی بر روی سلول‌های مزانشیمی: برای تأیید این که سلول‌های جدا شده متعلق به رده‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند، شاخص‌های سطحی این سلول‌ها توسط فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سلول‌های تلخیص شده، شاخص‌های CD105 (۲/۳ ± ۷۰/۴ درصد)، CD90 (۲/۵ ± ۸۲/۴ درصد)، CD44 (۷/۸ ± ۸۸/۲ درصد) و CD73 (۱/۶ ± ۸۷/۱ درصد) را در سطح خود بیان می‌کرد و از نظر شاخص‌های CD43 (۰/۱۱ ± ۰/۷۷ درصد) و CD45 (۰/۱۶ ± ۱/۱۲ درصد) منفی بود. با استفاده از این آنتی‌بادی‌ها، امکان تمایز بین سلول‌های مزانشیمی از سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های خونی و رده‌های میلوئیدی، وجود نداشت. نتیجه‌ی رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های پیش‌گفته، به وسیله‌ی فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان و چربی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در محیط تمایزی استخوان با رنگ‌آمیزی Alizarin-Red رنگ شدند. در زیر میکروسکوپ، استئوسیت‌های دارای ماتریکس خارج سلولی کلسیفیه شده به طور واضح مشخص‌گردید. همچنین، در محیط تمایزی چربی با رنگ‌آمیزی Avil red O109 رنگ شدند. واکوئل‌های لیپیدی داخل سلولی در این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز شدند که نشان دهنده‌ی تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی می‌باشد.

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده با سنجش تفرق دینامیکی نور با استفاده از PEG: بیشترین وزیکول‌های استخراج شده در محدوده‌ی ۱۰۰-۸۰ نانومتر بود و محدوده‌ی اندازه‌ی ذرات بین ۳۰۰-۵۰ نانومتر بود که به نظر می‌رسد به دلیل رسوب ذرات PEG بر روی اگزوزوم‌ها، ذرات بزرگ‌تر از حد معمول دیده شدند.

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره با استفاده از PEG: نتایج نشان داد اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای ظاهری کروی با دامنه‌ی اندازه‌ی ۲۵۰-۴۰ نانومتر هستند؛

البته، با این روش مقداری از رسوب ذرات PEG بر روی اگزوزوم‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۱-A).

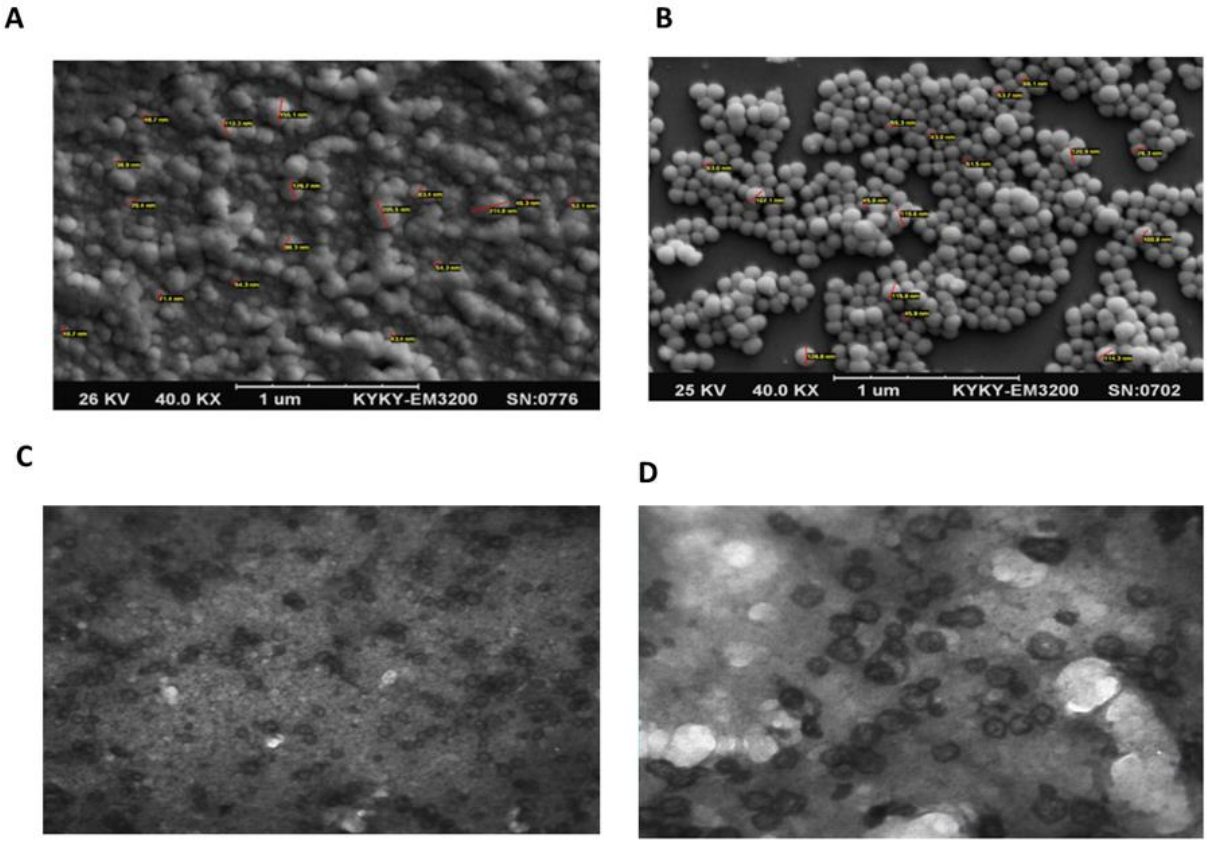
بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره با استفاده از PEG: بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری با استفاده از روش PEG، اگزوزوم‌هایی با ظاهر کروی، فنجانی شکل با دو لایه غشای لیپیدی را نشان داد. استخراج اگزوزوم ها با استفاده از این روش مورد تأیید قرار گرفت. البته، با این روش مقداری از رسوب ذرات PEG بر روی اگزوزوم‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۱- C).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط سنجش تفرق دینامیکی نور با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ: سنجش توزیع تعداد توسط DLS پیک حدود ۱۰۰-۳۰ نانومتری را برای جمعیت اگزوزوم‌های جداسازی شده نشان داد که مطابق با اندازه‌ی استاندارد اگزوزوم بود.

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ: میکروسکوپ الکترونی نگاره، وزیکول‌هایی با اندازه‌های متفاوت، در محدوده‌ی ۱۵۰-۳۰ نانومتر را نشان می‌داد و بیشتر وزیکول‌ها، اندازه‌ی کوچک‌تر از ۲۰۰ نانومتر داشتند. این اندازه، مطابق با اندازه‌ی گزارش شده برای اگزوزوم و تأیید صحت جداسازی آن‌ها بود (شکل ۱-B).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره با استفاده از اولترا سانتریفیوژ: بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ T، اگزوزوم هایی با ظاهر کروی، فنجانی شکل با دولایه غشای لیپیدی را نشان داد. استخراج اگزوزوم ها با استفاده از این روش به طور کامل مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱-D).

روش Bradford برای تعیین غلظت اگزوزوم: میزان غلظت اگزوزوم استخراج شده با استفاده از روش اولترا سانتریفیوژ، ۱۲۹۶/۷ میکروگرم/میلی‌لیتر و میزان غلظت اگزوزوم استخراج شده با استفاده از PEG، ۱۳۲۲/۴ میکروگرم/میلی‌لیتر گزارش شد.



شکل ۱. A: اگزوزوم‌های جداسازی شده با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (Polyethylene glycol یا PEG) دارای ظاهری کروی با دامنه‌ی اندازه‌ی ۲۵۰-۴۰ نانومتر هستند. B: اگزوزوم‌های جداسازی شده با استفاده از اولترا سانتریفیوژ دارای ظاهری کروی با دامنه‌ی اندازه‌ی ۱۵۰-۳۰ نانومتر هستند. C: اگزوزوم‌های جداسازی شده با استفاده از PEG دارای ظاهری کروی هستند که البته ذرات PEG روی آن‌ها رسوب کرده است. D: اگزوزوم‌های جداسازی شده با استفاده از اولترا سانتریفیوژ ظاهری کروی با لایه‌ی لیپیدی را نشان می‌دهند.

بحث

در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شده که با پیشرفت‌های زیادی همراه بوده است. با این حال، هنوز مشکلات متعددی وجود دارد که امکان استفاده‌ی درمانی از این سلول‌ها را محدود می‌کند (۱۲-۱۱). پیوند ضعیف، فرسایش عملکردی و قدرت تمایز محدود شده‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط In vivo، از جمله موانعی هستند که می‌توانند کارایی درمانی این سلول‌ها را تا حد زیادی تحت‌الشعاع قرار دهند (۱۴-۱۳). امکان تمایز خودبه‌خودی این سلول در مدل‌های In vivo نیز از محدودیت‌های دیگر استفاده از این سلول‌ها می‌باشد (۱۵-۱۱)؛ البته، احتمال بروز واکنش‌های ازدیاد حساسیت ناشی از رد ایمنی نیز همچنان وجود دارد (۱۷-۱۶).

با توجه به محدودیت‌های پیش‌گفته، در سال‌های اخیر توجه دانشمندان به سمت نوعی استفاده‌ی غیر مستقیم از سلول‌های بنیادی مزانشیمی معطوف شده است که بر پایه‌ی استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از این سلول‌ها شکل گرفته است (۱۸). اگزوزوم‌ها مدیاتور بسیاری از تأثیرات پاراکرین سلول‌ها شناخته می‌شوند (۱۹). کارایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌تواند بازتابی از ویژگی‌های ضد التهابی، ترمیمی و بازسازی کننده‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌های مادر این اگزوزوم‌ها باشد (۲۰). اگزوزوم‌ها، در مقایسه با سلول‌ها از نظر ساختاری و عملکردی با ثبات‌تر هستند (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از اگزوزوم‌ها در درمان، می‌تواند به عنوان یک راه‌کار جدید در جهت غلبه بر محدودیت‌های استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان مورد توجه قرار گیرد (۲۲).

تفاوت در روش‌های جداسازی اگزوزوم‌ها بر این اساس است که کدام روش مؤثرترین توانایی را برای جداسازی اگزوزوم‌ها دارد. در پژوهش‌های انجام شده، دو روش اولترا سانتریفیوژ و PEG را مقایسه کرده‌اند که نتایج به دست آمده از مقایسه‌ی این دو روش، نشان می‌دهد که استفاده از اولترا سانتریفیوژ روش مؤثرتری می‌باشد و ذرات جدا شده با روش اولترا سانتریفیوژ، دارای خلوص بیشتری می‌باشند. از جمله مزایای استفاده از اولترا سانتریفیوژ، می‌توان به ظرفیت بالا برای استخراج اگزوزوم، خلوص بالا و کاهش آلودگی اشاره کرد. معایب اولترا سانتریفیوژ، شامل نیاز به تجهیزات گران‌قیمت، زمان زیاد برای Run شدن و سرعت بالای سانتریفیوژ است که می‌تواند به اگزوزوم آسیب وارد کند (۲۳).

البته، PEG نیز از مزایایی نظیر استفاده‌ی آسان، عدم نیاز به تجهیزات ویژه و ظرفیت استخراج بالا برخوردار است. معایب این روش، نیاز به up Clean کردن قبل و بعد از استخراج و احتمال رسوب پروتئین همراه اگزوزوم و سایر آلودگی‌ها می‌باشد (۲۴، ۱۰). در نتیجه، بهینه‌سازی روش‌های جداسازی و جمع‌آوری اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌تواند در آینده‌ای نزدیک باعث رویکرد جدید سلول‌درمانی بر مبنای اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد.

با شناخت بهتر ویژگی‌های ایمونومدولاتوری سلول‌های مزانشیمی، بحث استفاده از این سلول‌ها در بیماری‌های خودایمن مطرح شد. این سلول‌ها، دارای توانایی تعدیل فعالیت و تکثیر سلول‌های T هستند. در بیماری آرتریت روماتوئید، استفاده از این سلول‌ها باعث کاهش التهاب موضعی در مفاصل و کاهش سیتوکاین‌های پیش‌التهابی موجود در سرم می‌گردد. اثرات درمانی این سلول‌ها، با کاهش سلول‌های T helper 17 1/T helper (Th1/Th17)، افزایش ترشح اینترلوکین ۱۰ و تولید بیشتر سلول‌های T تنظیمی همراه است. علاوه بر کاهش التهاب موضعی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، دارای اثرات سیستمیک می‌باشند و سبب جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی میزبان به سمت پاسخ‌های Th2 و Regulatory T cells (Treg) می‌گردند. در مطالعه‌ی Zhang و همکاران نشان داده شد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، همانند سلول مادری که از آن منشأ می‌گیرند، می‌توانند باعث افزایش القای سلول‌های Treg در سلول‌های T فعال شده شوند، اما بر سلول‌های T بکر که با آنتی‌ژن تحریک نشده باشند، این تأثیر را ندارند (۱۶). Fattore و همکاران، در مطالعه‌ای با بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر لنفوسیت‌های T، مشاهده کردند که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در اثر تحریک با Anti-CD3/CD28، باعث تکثیر سلول‌های Treg می‌شود (۲۵). Chen و همکاران، در مطالعه‌ای با بررسی اثرات تعدیل کنندگی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نشان دادند که اگزوزوم‌های مشتق از سلول بنیادی مزانشیمی، باعث افزایش سلول‌های Treg می‌شوند (۲۶). Fattore و همکاران، در مطالعه‌ای که اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر لنفوسیت‌های T را بررسی می‌کردند، مشاهده کردند که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اثر تحریک با Anti-CD3/CD28، باعث تکثیر سلول های Treg و افزایش ترشح سیتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر اینترلوکین ۱۰ می‌شود (۲۵).

Chen و همکاران، در مطالعه‌ای بر روی اثرات تعدیل کنندگی اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی، نشان دادند که این اگزوزوم‌ها، باعث افزایش سلول‌های Treg، افزایش Transforming growth factor beta (TGFβ) و کاهش Tumor necrosis factor alpha (TNFα) و Interleukin 1 beta

(IL-1β) در Peripheral blood mononuclear cell (PBMC)های تیمار شده با Concanavalin A (ConA) می‌شود. همچنین، القای سلول‌های Th2 را افزایش می‌دهند (۳۰-۲۷).

نتیجه‌گیری

اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بسیاری از شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که می‌توان از آن‌ها برای انتقال دارو یا ژن به بافت یا سلول هدف استفاده کرد؛ در نتیجه، استفاده‌ی درمانی از اگزوزوم‌ها به عنوان یک روش درمانی غیر سلولی، می‌تواند توجیه مناسبی برای جایگزینی آن در روش‌های معمول سلول‌درمانی باشد. در نتیجه، بهینه‌سازی روش‌های جداسازی و جمع‌آوری این اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌تواند در آینده‌ای نزدیک باعث رویکرد جدید سلول‌درمانی بر مبنای اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه‌ی دکتری ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد که هزینه‌ی اجرای آن، توسط دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره‌ی ۹۶۰۰۵۲۶۰ تأمین شده است. بدین‌وسیله گروه مجری از کلیه‌ی همکاران محترم صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که پیگیری‌های لازم در این زمینه را انجام داده‌اند تقدیر و تشکر می‌نماید.

References

1. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. Theranostics 2017; 7(3): 789-804.
2. Batrakova EV, Kim MS. Development and regulation of exosome-based therapy products. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2016; 8(5): 744-57.
3. Egea-Jimenez AL, Zimmermann P. Lipids in exosome biology. Handb Exp Pharmacol 2019. [Epub ahead of print].
4. Shimasaki T, Yamamoto S, Arisawa T. Exosome research and co-culture study. Biol Pharm Bull 2018; 41(9): 1311-21.
5. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of exosome composition. Cell 2019; 177(2): 428-45.
6. Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Nagaeva O, Dehlin E. Isolation and characterization of exosomes from cultures of tissue explants and cell lines. Curr Protoc Immunol 2016; 115(1): 14.
7. Ludwig N, Hong CS, Ludwig S, Azambuja JH, Sharma P, Theodoraki MN, et al. Isolation and analysis of tumor-derived exosomes. Curr Protoc Immunol 2019; 127(1): e91.
8. Helwa I, Cai J, Drewry MD, Zimmerman A, Dinkins MB, Khaled ML, et al. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. PLoS One 2017; 12(1): e0170628.
9. Chang M, Chang YJ, Chao PY, Yu Q. Exosome purification based on PEG-coated Fe3O4 nanoparticles. PLoS One 2018; 13(6): e0199438.
10. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG, Jr. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. Sci Rep 2016; 6: 23978.
11. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. Regen Med 2011; 6(4): 481-92.
12. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. Cell 2014; 159(3): 499-513.
13. Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. Pharm Res 2015; 32(6): 2003-14.
14. O'Loughlin AJ, Woffindale CA, Wood MJ. Exosomes and the emerging field of exosome-based gene therapy. Curr Gene Ther 2012; 12(4): 262-74.
15. Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. Semin Cell Dev Biol 2015; 40: 82-8.
16. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Tan SS, Choo AB, Lim SK. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. Stem Cells Dev 2014; 23(11): 1233-44.
17. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. Int J Mol Sci 2014; 15(3): 4142-57.
18. Kourembanas S. Exosomes: Vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. Annu Rev Physiol 2015; 77: 13-27.
19. 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): 2135-40.
20. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, et al. Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2013; 65(3): 336-41.
21. Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. Exp Mol Med 2017; 49(6): e346.
22. Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: A two-edged sword in cancer therapy. Int J Nanomedicine 2019; 14: 2847-59.
23. Skottvoll FS, Berg HE, Bjorseth K, Lund K, Roos N, Bekhradnia S, et al. Comparison of ultracentrifugation and a commercial kit for isolation

of exosomes derived from glioblastoma and breast cancer cells. bioRxiv 2018; 274910.
24. Weng Y, Sui Z, Shan Y, Hu Y, Chen Y, Zhang L, et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. Analyst 2016; 141(15): 4640-6.
25. Del Fattore A, Luciano R, Pascucci L, Goffredo BM, Giorda E, Scapaticci M, et al. Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes. Cell Transplant 2015; 24(12): 2615-27.
26. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. Nat Rev Rheumatol 2014; 10(6): 356-64.
27. Chen W, Huang Y, Han J, Yu L, Li Y, Lu Z, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. Immunol Res 2016; 64(4): 831-40.
28. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbruger TL, Tolmachova T, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. Nat Commun 2015; 6: 7321.
29. Du YM, Zhuansun YX, Chen R, Lin L, Lin Y, Li JG. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. Exp Cell Res 2018; 363(1): 114-20.
30. Tavasolian F, Abdollahi E, Rezaei R, Momtazi-Borojeni AA, Henrotin Y, Sahebkar A. Altered expression of microRNAs in rheumatoid arthritis. J Cell Biochem 2018; 119(1): 478-87.

DOI: *10.22122/jims.v38i562.12770* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 562, 2nd Week, April 2020**

Received: 19.02.2020 Accepted: 29.02.2020 Published: 12.04.2020

Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes by Method of Ultracentrifuge and Polyethylene Glycol

Fataneh Tavasolian[1], Ahmad Zavaran-Hosseini[2], Sara Soudi[3], Mahmood Naderi[4]

Original Article

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs)-derived exosomes can function similar to MSCs in repairing damaged tissues and modulating immune responses. They are considered as an effective tool in regenerative medicine as well as autoimmune diseases and cancer.

Methods: MSCs were isolated from adipose tissue of mice, and characterized. Cell supernatant was used for extraction of exosomes using ultracentrifugation with 110000 g and polyethylene glycol (PEG). Dynamic light scattering (DLS) technique, transmission electron microscopy, and Bradford assay were used to evaluate the accuracy of the isolated exosomes.

Findings: The results of isolation of exosomes derived from MSCs using PEG showed that most of the extracted spherical exosomes were in the range of 50-300 nm; but the results of isolation of exosomes derived from MSCs using ultracentrifuge showed the range of 30-100 nm. Using Bradford test, the concentration of exosomes extracted was recorded as 1296.7 mg/ml by ultracentrifugation and 1322.4 mg/ml by PEG.

Conclusion: Comparison of two methods of separation of exosomes showed that the extracted exosomes were more purified by ultracentrifugation; but in PEG method, the exosomes were larger and less purified due to PEG deposition on the particles. However, because of less access to ultracentrifuge, PEG separation is also applicable.

Keywords: Exosome; Mesenchymal stem cells; Ultracentrifugation; Polyethylene glycols

Citation: Tavasolian F, Zavaran-Hosseini A, Soudi S, Naderi M. **Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes by Method of Ultracentrifuge and Polyethylene Glycol.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(562): 31-8.

1- PhD Student, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of immunology, School of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Cell-Based Therapies Research Center, Digestive Disease Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Ahmad Zavaran-Hosseini, Professor, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Email: zavarana@modares.ac.ir