

عنوان و نام پدیدآور	مقدمه‌ای بر اگزوزوم و کاربرد آن در مهندسی بافت/ مولفین لیلا رضاخانی ... [و دیگران].
مشخصات نشر	تهران: رویان پژوه، ۱۴۰۳.
مشخصات ظاهری	۱۴۳ ص: مصور، جدول، نمودار.
شابک	۹۷۸-۶۲۲-۳۲۰-۳۴۴-۲
وضعیت فهرست نویسی	فیفا
یادداشت	مولفین لیلا رضاخانی، مرتضی علی‌زاده، محمد عینی، نیلوفر الداغی، شقایق دودی، ملیحه غریب‌شاهیان، طیبه‌سادات طباطبایی.
یادداشت	واژه‌نامه.
یادداشت	کتابنامه.
موضوع	اگزوزوم‌ها - Exosomes
	بافت‌ها — مهندسی - Tissue engineering
شناسه افزوده	رضاخانی، لیلا، ۱۳۵۹ -
رده بندی کنگره	QH۶۰۳
رده بندی دیویی	۵۷۴/۸۷
شماره کتابشناسی ملی	۹۷۲۸۸۵۹



مقدمه‌ای بر اگزوزوم و کاربرد آن در مهندسی بافت

مولفین: دکتر لیلا رضاخانی، دکتر مرتضی علی‌زاده، محمد عینی، دکتر نیلوفر الداغی
دکتر شقایق دودی، دکتر ملیحه غریب‌شاهیان، طیبه‌سادات طباطبایی

ناشر: رویان پژوه
نوبت چاپ: اول - ۱۴۰۳
صفحه آرا: آتلیه رویان پژوه
چاپ و صحافی: نور
قطع و تعداد صفحات: وزیری - ۱۴۴
شمارگان: ۳۰۰ نسخه
بها: سایت انتشارات



شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۳۲۰-۳۴۴-۲

کلیه حقوق مادی و معنوی اثر متعلق به ناشر است و هرگونه تکثیر، بازنویسی، خلاصه‌برداری و یا برداشت به هر نحوی بدون اجازه کتبی از ناشر مجاز نبوده و منجر به پیگرد قانونی می‌باشد.

دفتر نشر و نمایشگاه دائمی: تهران، خیابان انقلاب، بین ۱۲ فروردین و منیری جاوید (روبروی دبیرخانه دانشگاه تهران)
ساختمان کتاب‌های جیبی، طبقه سوم تلفن: ۶۶۹۷۰۷۴۰ - ۶۶۴۸۶۳۷۳

خرید آنلاین [www. RPpub. ir](http://www.RPpub.ir)

فهرست

پیشگفتار	۹
فصل اول: تعریف و بیوژنز اگزوزومها	۱۱
مقدمه	۱۱
محتوای اگزوزومها	۱۲
بیوژنز اگزوزوم	۱۵
عملکرد اگزوزوم ها	۱۷
منابع	۲۰
فصل دوم: منابع تهیه اگزوزومها	۲۳
۱. سلولهای خونی	۲۴
۲. سلولهای ایمنی	۲۴
۳. سلولهای بنیادی	۲۴
۴. سلولهای سرطانی	۲۴
۵. سلولهای سیستم عصبی	۲۵
۶. سلولهای اپیتلیال	۲۵
۷. کاردیومیوسیتها	۲۵
۸. سلولهای کبدی	۲۵
۹. سلولهای اندوتلیال	۲۵
۱۰. سلولهای چربی	۲۵
۱۱. سلولهای جفت	۲۶
۱۲. سایر منابع	۲۶
منابع	۲۷

فصل سوم: روش‌های جداسازی آگزوزوم‌ها.....	۲۹
مقدمه.....	۲۹
روش‌های جداسازی آگزوزوم.....	۳۰
سانتریفیوژ افتراقی.....	۳۰
سانتریفیوژ گرادیان چگالی.....	۳۰
فیلتراسیون.....	۳۱
ته‌نشین‌سازی و رسوب‌گیری.....	۳۲
جداسازی مبتنی بر قرابت ایمنی.....	۳۲
تکنیک‌های میکروفلوئیدیک.....	۳۳
خلاصه‌ای از روش‌های جداسازی آگزوزوم.....	۳۳
میزان بازیابی.....	۳۴
خلوص.....	۳۴
زمان و هزینه.....	۳۶
منابع.....	۳۶
فصل چهارم: روش‌های تعیین خصوصیات آگزوزومی.....	۳۹
تجزیه و تحلیل فراساختاری.....	۳۹
TEM.....	۳۹
میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....	۴۰
میکروسکوپ الکترونی برودتی (Cryo-EM).....	۴۰
میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM).....	۴۰
NTA.....	۴۱
AF۴.....	۴۱
RPS.....	۴۳
فلوسیتومتری.....	۴۳
پلت‌فرم‌های مشخصه‌یابی و تعیین خصوصیات در شرایط استخراج بافت از بدن	
(Ex vivo).....	۴۳
ردیابی آگزوزوم در داخل بدن.....	۴۴
ترافیک آگزوزوم.....	۴۴
پروتئین‌های آگزوزومی.....	۴۴
پروتئین‌های آگزوزومی: آپیکال در مقابل قاعده جانبی.....	۴۵

۴۵.....	اگزوزوم به عنوان نشانگرهای زیستی.....
۴۶.....	پروتئین‌های اگزوزومی: متصل به سطح در مقابل کپسوله
۴۶.....	میکرو RNA اگزوزومی (miRNA-miR).....
۴۷.....	منابع
۵۱	فصل پنجم: ایمنی شناسی اگزوزوم‌ها.....
۵۱	نقش اگزوزوم‌ها در پاسخ‌های ایمنی.....
۵۵.....	مدولاسیون و فرار از سیستم کمپلمان توسط اگزوزوم‌ها.....
۵۸.....	مزایای استفاده از اگزوزوم برای ایمونوتراپی
۶۰.....	منابع
۶۱	فصل ششم: اگزوزوم‌ها به عنوان نشانگر زیستی (بیومارکر).....
۶۶.....	پروتئین‌های اگزوزومی به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی
	۱. اسیدهای نوکلئیک اگزوزومی (DNA- RNA) به عنوان نشانگرهای زیستی
۶۹.....	تشخیصی
	۲. اگزوزوم‌های مشتق از سایر سیالات زیستی به عنوان نشانگرهای زیستی
۷۴.....	تشخیصی
۷۵.....	۳. اگزوزوم و ظرفیت‌های متمایز آن در زمینه پیوند
۸۰.....	نتیجه‌گیری
۸۰.....	منابع
۸۹	فصل هفتم: کاربرد اگزوزوم‌ها به عنوان نانوحامل.....
۹۱	اصلاح پس از جداسازی
۹۱	روش‌های غیرفعال بارگذاری محموله
۹۱	انکوباسیون اگزوزوم‌ها با محموله.....
۹۳.....	روش‌های فعال بارگذاری محموله.....
۹۳.....	۱. فراصوت
۹۴.....	۲. اکستروژن.....
۹۴.....	۳. چرخه‌های انجماد و ذوب.....
۹۴.....	۴. الکتروپوراسیون
۹۵.....	۵. انکوباسیون اگزوزوم‌ها با نفوذپذیرهای سطحی
۹۶.....	۶. اصلاح شیمیایی سطح اگزوزوم‌ها با روش شیمی click.....

۷. ترانسفکشن	۹۶
۸. آنتی بادی علیه پروتئین‌های آگروزومی	۹۷
تحویل عوامل درمانی با استفاده از آگروزوم	۹۹
۱. آگروزوم‌ها به عنوان حامل مولکول‌های کوچک درمانی	۹۹
۲. آگروزوم‌ها به عنوان حامل ژن‌ها (به عنوان مثال siRNA، miRNA و lncRNA)	۱۰۰
۳. آگروزوم‌ها به عنوان حامل مولکول‌های بزرگ درمانی	۱۰۱
۴. آگروزوم‌ها به عنوان حامل نانوذرات	۱۰۱
۵. آگروزوم‌ها به عنوان حامل ترکیبات دارویی	۱۰۱
۶. آگروزوم‌ها به عنوان حامل محصولات طبیعی	۱۰۲
۷. آگروزوم‌ها به عنوان حامل دارو در درمان سرطان و ایمونوتراپی	۱۰۲
منابع	۱۰۳

فصل هشتم: نقش‌های نوظهور وزیکول‌های خارج سلولی در مهندسی بافت و پزشکی

بازسازی	۱۰۵
آگروزوم‌ها در بازسازی پوست	۱۰۷
کاربرد آگروزوم‌ها در بازسازی بافت استخوان	۱۱۱
مکانیسم‌های آگروزوم‌های مشتق از MSCs در بازسازی استخوان	۱۱۴
کاربرد آگروزوم‌ها در بازسازی بافت غضروف	۱۱۶
کاربرد آگروزوم‌ها برای بازسازی بافت قلب	۱۱۹
کاربرد آگروزوم‌ها در بازسازی ریه	۱۲۳
کاربرد آگروزوم‌ها در بیماری‌های عصبی	۱۲۴
کاربرد آگروزوم‌ها در سکته‌ی مغزی و آسیب مغزی تروماتیک (TBI)	۱۲۵
کاربرد آگروزوم‌ها در مهندسی بافت تولید مثل	۱۲۷
کاربرد آگروزوم‌ها در بازسازی سیستم کبدی	۱۲۸
کاربرد آگروزوم‌ها در بازسازی آسیب‌های کلیه	۱۲۹
کاربرد آگروزوم‌ها در ترمیم تاندون	۱۳۰
کاربرد آگروزوم‌ها در درمان سرطان	۱۳۱
سایر بیماری‌ها	۱۳۲
منابع	۱۳۳
واژه‌نامه	۱۳۷

در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به وزیکول‌های خارج سلولی (Extracellular Vesicles) شده است. کاربردهای تشخیصی، درمانی و شناختی این وزیکول‌ها، آنان را به چشم‌انداز روشنی برای آینده علوم حوزه سلامت مبدل ساخته است. درمان بر پایه اگزوزوم به عنوان یک رویکرد جدید برای ترمیم بافت آسیب دیده قابل توجه است. از میان تعدادی از استراتژی‌ها برای رسیدن به ترمیم، مهندسی بافت به تدریج به یک رویکرد امیدوارکننده برای رفع نیازهای آینده بیماران تبدیل شده است. تلفیق مهندسی بافت با نانوذرات اگزوزوم گامی بلند در پیشرفت علم پزشکی بازساختی می‌تواند باشد که در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است.

نظر به اهمیت آشنایی دانشجویان تحصیلات تکمیلی به ویژه مقاطع دکتری تخصصی رشته‌هایی چون مهندسی بافت، با ساخت داربست‌های حاوی اگزوزوم و تجربه‌ی هر چند کوتاه تدریس این واحدهای درسی توسط برخی نویسندگان این کتاب و تجربه‌ی خوب نویسندگان در تحقیقات مبتنی بر حوزه‌ی مهندسی بافت و اگزوزوم، بهانه‌ای برای تألیف و گردآوری کتاب حاضر شد.

همانطور که از نام کتاب مشخص است، نوشتار حاضر تنها مقدمه‌ای برای آشنایی با اگزوزوم و مهندسی بافت است. نویسندگان امیدوارند این کتاب مورد استفاده‌ی علاقمندان قرار بگیرد و آماده‌ی دریافت نظرات و پیشنهادات خوانندگان عزیز می‌باشد.

با احترام

نویسندگان- بهار ۱۴۰۳

تعریف و بیورژنر اگزوزوم‌ها

مقدمه

اکثر سلول‌های زنده طیفی از وزیکول‌های خارج سلولی^۱ (EVs) با اندازه ۲۰-۲۰۰ نانومتر را آزاد می‌کنند. این وزیکول‌های خارج سلولی لیپیدی بر اساس اندازه، عملکرد و منشأ سلولی خود به عنوان میکرووزیکول‌ها^۲ (MVs) (همچنین به عنوان وزیکول‌های ریزشی^۳ یا اکتوزوم شناخته می‌شوند)، میکروذرات، پروستازوم‌ها (از غده پروستات)، تولروزوم‌ها^۴ (از سلول‌های اپیتلیال روده) و اجسام آپوپتوزی، نانوزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها دسته بندی می‌شوند. هرچند محتوای این وزیکول‌های خارج سلولی به منشأ آنها بستگی دارد اما آنها عمدتاً حاوی مولکول‌های زیست فعالی مانند اسیدهای نوکلئیک، microRNA، لیپیدها و پروتئین‌ها هستند که این مولکول‌ها به سلول‌های مجاور و دورتر تحویل داده می‌شوند. بنابراین EV می‌تواند سرنوشت و عملکرد سلول گیرنده را تغییر دهند و در نتیجه میکرومحیط اطراف را تعدیل کنند. سه زیرگروه اصلی EVs شامل میکروویزیکول‌ها، اگزوزوم‌ها و اجسام آپوپتوزی هستند که بر اساس بیورژنر، مسیرهای انتشار، اندازه، محتوا و عملکردشان متمایز می‌شوند.

اگزوزوم‌ها به عنوان مشتقات سیستم اندوزومی با مورفولوژی فنجانی شکل تعریف می‌شوند که شامل وزیکول‌های دولایه لیپیدی فنجانی یا کروی در سایز حدود ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند که از ادغام اجسام چند وزیکولی با غشای پلاسمایی و آزادسازی خارج سلولی وزیکول‌های داخل مجرای به دست می‌آیند. اگزوزوم‌ها توسط سلول‌هایی با منشأ خونساز و غیر خونساز ترشح می‌شوند و با چگالی ۱/۱۳-۱/۱۹ g/ml

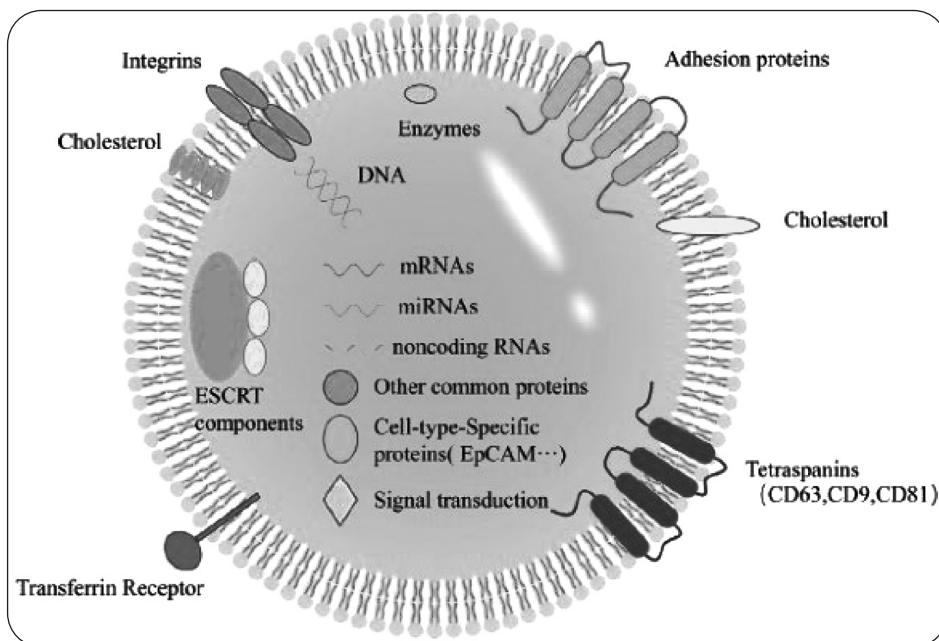
1. Extracellular vesicles
2. Micro vesicles
3. Shedding vesicles
4. Tolerosomes

در محلول گرادیان چگالی ساکارز شناور هستند. علاوه بر این اگزوزوم‌ها در تمام مایعات بدن از جمله پلاسما خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار، بزاق و شیر مادر نیز شناسایی شده‌اند.

در سال ۱۹۸۱ ترامس و همکارانش وزیکول‌های مشتق شده از غشای پلاسمایی را به عنوان "اگزوزوم" معرفی کردند. این اگزوزوم‌ها شامل وزیکول‌های غشایی با فعالیت آنزیم ۵'-نوکلئوتیدی گزارش شدند که ممکن بود عملکردهای فیزیولوژیکی داشته باشند و از مایع رویی حاصل از کشت رده‌های سلولی مختلف منشأ گرفتند. اما مفهوم فعلی اگزوزوم‌ها در سال ۱۹۸۳ در دو مقاله مستقل که به ترتیب توسط هاردینگ و همکارانش و پن و همکارانش منتشر شد، بازمی‌گردد. در این مطالعات، نویسندگان گلبول‌های قرمز نابالغ - رتیکولوسیت‌ها را با گیرنده‌های ترانسفرین نشان‌دار کشت دادند تا حرکت گیرنده‌های ترانسفرین را از غشای پلاسما به داخل رتیکولوسیت‌ها ردیابی کنند. با کمال تعجب، مشاهده شد که گیرنده‌های ترانسفرین نشان‌دار در داخل رتیکولوسیت‌ها درونی می‌شوند و سپس در وزیکول‌های کوچک (حدود ۵۰ نانومتر) داخل آن‌ها بسته‌بندی می‌شوند. این وزیکول‌ها، که در ابتدا تصور می‌شد خارج سلولی هستند تا برای تخریب به لیزوزوم‌ها منتقل شوند، متعاقباً از رتیکولوسیت‌های خون در حال بلوغ به فضای خارج سلولی ترشح می‌شوند. بعدها، در سال ۱۹۸۹، جانستون و همکارانش این وزیکول‌ها را "اگزوزوم" نامیدند. از زمانی که ولدی و همکارانش اولین بار در سال ۲۰۰۷ بیان نمودند که اگزوزوم‌ها حامل RNA هستند، ترکیب و عملکرد این وزیکول‌ها به طور گسترده‌تر مورد مطالعه قرار گرفت.

محتوای اگزوزوم‌ها

محتوای لیپید و پروتئین اگزوزوم‌ها به طور گسترده با تکنیک‌های مختلف از جمله وسترن بلات، مرتب‌سازی سلولی فعال شده با فلورسانس، ایمونو-EM^۱ و طیف سنجی جرمی آنالیز شده است. اگزوزوم با توجه به مبدأ خود دارای اجزای متفاوتی هستند. مطالعات نشان داده است که تاکنون نزدیک به ۳۵۰۰۰۰ پروتئین، ۴۰۰۰۰ اسید نوکلئیک و ۶۰۰ لیپید در اگزوزوم‌های مختلف وجود دارد که با تحویل به سلول‌های مجاور و سلول‌های مناطق دورتر بر سرنوشت و عملکرد سلول گیرنده و در نتیجه تعدیل میکرومحیط اطراف تأثیر می‌گذارد (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: ساختار اگزوزومها (برگرفته از (Chen et al (۲۰۲۲)

پروتئین‌ها بخش قابل توجهی از محتوای اگزوزوم‌ها را به خود اختصاص می‌دهند که از طریق اندوسیتوز، همجوشی غشاء و سیتوپلاسم سلول مبدأ ایجاد می‌شوند. با این حال، این بدان معنا نیست که پروتئین‌های اگزوزومی تصادفی هستند. به عنوان مثال، پروتئین‌ها از میتوکندری، دستگاه گلژی، هسته و شبکه آندوپلاسمی مشتق می‌شوند. به طور کلی، پروتئین‌ها را می‌توان به پروتئین‌های عمومی و اختصاصی تقسیم کرد. پروتئین‌های عمومی تقریباً در تمام اگزوزوم‌ها وجود دارند و نقش‌های کلیدی را بر عهده دارند، مانند پروتئین‌های مربوط به انتقال و همجوشی غشایی (Rab, GTPases, flotillin)، پروتئین‌های مربوط به سنتز اجسام چندوزیکولی (Alix, TSG 101)، تتراسپانین‌ها (CD9, CD63, CD81, CD82)، مولکول چسبندگی (مولکول چسبندگی بین سلولی-۱، CD9، CD146، فاکتور EGF VIII گلبول چربی شیر چسبندگی (MHC I و MHC II) تسهیل کنند. بنابراین، وجود اگزوزوم‌ها را می‌توان با شناسایی پروتئین‌های رایج آنها تأیید کرد.

پروتئین‌های Rabs اتصال اگزوزوم و رویدادهای همجوشی غشایی را تقویت می‌کنند. آنکسین‌ها، از جمله آنکسین I، II، V و VI، دینامیک اسکلت سلولی غشاء و رویدادهای همجوشی غشا را تنظیم می‌کنند. پروتئین‌های شوک حرارتی Hsp70 و Hsp90 می‌توانند بارگذاری پپتید را روی کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC I و MHC II) تسهیل کنند. بنابراین، وجود اگزوزوم‌ها را می‌توان با شناسایی پروتئین‌های رایج آنها تأیید کرد.

پروتئین‌های اختصاصی از سلول‌های منشأ اگزوزوم‌ها مشتق می‌شوند. به عنوان مثال، اگزوزوم‌های آسیت بدخیم ترشح شده توسط بیماران سرطان تخمدان حاوی پروتئین‌های چسبنده سلول‌های اپیتلیال (CD24 و EpCAM) هستند. بنابراین، با شناسایی پروتئین‌های اختصاصی موجود در اگزوزوم‌های مشتق از تومور می‌توان منشأ اگزوزوم‌ها را تأیید کرد، بیماری‌های مرتبط را تشخیص داد و تأثیر درمان را ارزیابی کرد. ماتیوانان و سیمپسون پایگاه داده ExoCarta را راه‌اندازی کردند که امکان دسترسی آزاد به فهرستی از پروتئین‌ها و RNA یافت شده در اگزوزوم‌ها را فراهم می‌کند.

اگزوزوم‌ها دارای دولایه لیپیدی مشخص هستند که ضخامت متوسط آن ۵ نانومتر است. ترکیب لیپید اگزوزومی نیز به ویژگی‌های سلول منشأ آن بستگی دارد و به طور کلی حاوی کلسترول، اسفنگومیلین، فسفاتیدیل سرین، سرامید (گاهی برای تمایز اگزوزوم‌ها از لیزوزوم‌ها استفاده می‌شود) و غیره است. زنجیره‌های چربی آسیل سطح بیرونی اگزوزوم‌ها غنی از زنجیره‌های ساکاریدی مانند مانوز، پلی لاکتوآمین، آلفا-۲،۶ سیالیک اسید و گلیکان‌های متصل به N است. این لیپیدها ساختار غشایی پایدار اگزوزوم‌ها را تشکیل می‌دهند که نه تنها از محتویات اگزوزوم در برابر تخریب محافظت می‌کنند، بلکه بیوزن اگزوزوم‌ها را نیز تنظیم می‌کنند. این پایداری اگزوزوم‌ها را به گزینه‌ای بالقوه برای تحویل دارو در داخل بدن تبدیل می‌کند. اثرات حامل‌های داروی بر پایه اگزوزوم (حامل RNA مداخله‌گر مختص KRAS انکوژنیک) بر سرکوب سرطان پانکراس در مدل‌های مختلف موشی ارزیابی شده است. نتایج نشان داد درمان با حامل‌های داروی اگزوزومی به طور موثری سرطان را سرکوب می‌کند و به طور مشهودی بقای کلی را افزایش می‌دهد زیرا اگزوزوم‌ها می‌توانند خود را از فاگوسیتوز توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها محافظت کنند. در مطالعه دیگر نقش لیپیدهای اگزوزومی موجود در ادرار را در بررسی نشانگرهای مولکولی بیماران سرطان کلیوی بررسی نمودند. به طور کلی، عملکرد لیپید اگزوزومی می‌تواند برای تشخیص سرطان و پتانسیل پیش‌آگهی مؤثر در نظر گرفته شود. ترکیب لیپیدهای موجود بر روی اگزوزوم‌ها نیز به منشأ سلولی آنها وابسته است. به عنوان مثال، نسبت کلسترول به فسفولیپید در اگزوزوم‌های مشتق از سلول B در مقایسه با اگزوزوم‌های ماست‌سل‌ها و رتی‌کولوسیت‌ها بیشتر است.

علاوه بر لیپیدها و پروتئین‌ها، اگزوزوم‌ها همچنین حاوی اسیدهای نوکلئیک متعددی از جمله اسید دئوکسی نوکلئیک (DNA)، اسید ریبونوکلئیک کد کننده و غیر کدکننده (RNA) مانند RNA پیام رسان (mRNA) و microRNA (miRNA) هستند. این اسیدهای نوکلئیک اغلب برای تعیین کمی دقیق پس از جداسازی اگزوزوم‌ها مورد نیاز هستند که وضعیت جهش سلول‌های منشأ اگزوزوم و بسیاری از شرایط و بیماری‌های پزشکی را منعکس می‌کنند. با توسعه رویکردهای توالی‌یابی نسل بعدی، RNA سلول، ssDNA و dsDNA را در اگزوزوم شناسایی شد. این اسیدهای نوکلئیک در اگزوزوم‌ها به طور مستقیم در