

مقاله پژوهشی

جداسازی، شناسایی و مقایسه آگروزوم‌های استخراج شده از سلول‌های بنیادی عصبی و آستروسیت‌های مغز موش صحرایی و اهمیت پتانسیل درمانی آنها در بیماری‌های نورودژنراتیو

اعظم کریمی^۱، الهام حویزی^{۲*}، لطف اله خواجه پور^۳، زهره قطب الدین^۴

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^{۲*} استاد سلولی تکوین، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: e.hoveizi@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

چکیده

مقدمه: استفاده از آگروزوم‌ها به عنوان رویکردی جدید بویژه برای درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی بسیار مورد توجه است. نوآوری این مطالعه ارائه تحلیل مقایسه‌ای ویژگی‌های بیومولکولی و مورفولوژیک آگروزوم‌های استخراج شده از سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) و آستروسیت‌های مغز، که پیش‌تر در تحقیقات آزمایشگاهی به‌طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا هدف از این مطالعه استخراج آگروزوم‌ها این سلول‌ها، شناسایی و مقایسه آنها جهت پیشبرد اهداف درمانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: NSCs و آستروسیت‌ها از مغز نوزاد موش صحرایی استحصال شدند و مارکرهای سطح آن‌ها به کمک ایمونوسیتوشیمی تایید شد. جداسازی آگروزوم‌ها با استفاده از کیت آناسل انجام شد. جهت تایید آگروزوم‌ها حضور CD مارکرها (CD9, CD63, CD81) با استفاده از وسترن بلات و تعیین غلظت آگروزوم‌ها با استفاده از روش بردفورد انجام شد. بررسی‌های مورفولوژی و اندازه قطر آگروزوم‌ها با استفاده از تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و DLS انجام شد.

نتایج: ایمونوسیتوشیمی حضور مارکرهای Nestin، Tuj-1 و GFAP را نشان داد. غلظت آگروزوم‌های استخراج شده به ترتیب در NSCs و آستروسیت‌ها معادل ۳۳۰/۵۲ و ۴۵۴/۱۹ میکروگرم/میلی لیتر بود. وسترن حضور مارکرهای CD9, CD81 و CD63 را بر سطح آگروزوم‌های استخراج شده تایید کرد. میانگین قطر آگروزوم‌های استخراج شده از NSCs و آستروسیت با استفاده از DLS، به ترتیب ۵۰/۴۵ و ۳۸/۶۱ نانومتر بود.

نتیجه‌گیری: این احتمال وجود دارد که آگروزوم‌های استخراج شده از آستروسیت‌ها به سبب مقدار پروتئین بیشتر و اندازه کوچکتر نسبت به آگروزوم‌های استخراج شده از NSCs توجه بیشتری را به عنوان یک رویکرد درمانی جدید در بیماری‌های سیستم عصبی به خود جلب کنند. اگرچه مطالعات بیشتر برای تایید و بررسی عملکرد بیولوژیکی و اثربخشی این آگروزوم‌ها در فرآیندهای ترمیم عصبی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آگروزوم، سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های آستروسیت، موش صحرایی.

مقدمه

سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) به عنوان سلول‌های پیش‌ساز سیستم عصبی مرکزی (CNS) تعریف می‌شوند که ظرفیت خود نوسازی و پتانسیل چند توانی برای تبدیل شدن به سلول‌های عصبی و گلیال را دارند. NSCs را می‌توان از بافت مغز جنین انسان و همچنین از چندین ناحیه از مغز انسان بالغ مانند پیاز بویایی، قشر مغز، هیپوکامپ یا ناحیه تحت بطنی بطن‌های جانبی جدا کرد. NSCs به دلیل توانایی خودتکثیری و تمایز نسبت به فنوتیپ‌های عصبی و گلیال، یک کاندید امیدوارکننده به جهت درمان مبتنی بر سلول برای آسیب‌های CNS هستند [۱]. همچنین آستروسیت‌ها، یکی از انواع سلول‌های گلیال هستند و نقش مهمی در حفظ ساختار و عملکرد CNS دارند. آستروسیت‌ها، در حمایت فیزیکی و متابولیکی از نورون‌ها، تشکیل و نگهداری سد خونی-مغزی (BBB)، تولید عوامل نوروتروفیک و محافظت عصبی و فرایندهای ترمیم CNS نقش دارند [۲]. آستروسیت‌ها نقش اصلی را در انتقال سیناپسی و پردازش اطلاعات توسط مدارهای عصبی دارند. با توجه به نقش حیاتی NSCs و آستروسیت‌ها در CNS و همچنین اهمیت مبادلات بین سلولی، به ویژه آنهایی که توسط آگروزوم‌ها واسطه می‌شوند، این سلول‌ها و ترشحات آنها برای تنظیم کنترل سلولی و تقویت ارتباطات پیچیده لازم برای رشد مناسب سلول‌های عصبی، عملکرد و هومئوستاز نورون‌ها ضروری هستند [۳].

آگروزوم‌ها نانو وزیکول‌های خارج سلولی با قطر ۳۰-۱۰۰ نانومتر هستند و تقریباً توسط تمامی سلول‌ها ترشح می‌شوند [۴]. این نانووزیکول‌ها به واسطه ی حمل اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر مواد فعال زیستی می‌توانند در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک بدن نقش داشته باشند. قابلیت آگروزوم‌ها در ورود به سلول‌های میزبان، سبب شده تا در مقایسه با حامل‌های مصنوعی همچون لیپوزوم‌ها و نانوذرات مزایای گسترده و منحصر به فردی را در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها داشته باشند [۵، ۶]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این نانووزیکول‌ها در بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تنظیم ایمنی، بازسازی اعصاب و سرطان نقش حیاتی دارند. شواهد موجود تأیید می‌کنند که آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی، محتویات خود را از طریق سیگنال

دهی پاراکرین از سلولی به سلول دیگر منتقل می‌کنند [۷]. آگروزوم‌های آزاد شده از سلول‌های سیستم عصبی (نورون، آستروسیت، الیگودندروسیت، میکروگلیا) در شکل پذیری سیناپسی، رابطه‌ی نورون-گلیا، محافظت عصبی و بازسازی عصبی نقش دارند [۸، ۹]. بهبود کوتاه‌مدت علائم بیماری و عوارض جانبی وابسته به دوز دارو در درمان دارویی برای بیماری‌های نورودژنراتیو، جامعه پزشکی را مجبور کرده است تا به دنبال درمانی مؤثر برای این تهدید جدی سلامت جهانی باشد. پتانسیل درمانی سلول‌های بنیادی برای درمان اختلالات نورودژنراتیو در سال ۱۹۸۰ شناسایی شد. سپس، مطالعات گسترده‌ای برای توسعه این استراتژی درمانی برای درمان بیماری‌های عصبی انجام شد. امروزه، سلول‌های بنیادی و ترشح آنها به عنوان یک محیط درمانی برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو شناخته شده‌اند. آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی، که بخش مهمی از ترشحات آنها هستند، به عنوان مسئول بخش مهمی از عملکرد درمانی این سلول‌ها هستند [۱۰]. تعداد فزاینده‌ای از مطالعات پیش بالینی، پیوند آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی را به عنوان یک استراتژی درمانی جدید در برابر زوال شناختی و تخریب عصبی پیشنهاد کرده‌اند. آگروزوم‌های مشتق شده از NSC حاوی تعداد زیادی مولکول فعال زیستی هستند که به طور بالقوه به تنظیم فعالیت رونویسی و فعالیت سیناپسی در نورون‌ها کمک می‌کنند و می‌توانند CREB و آبشار مولکولی مرتبط با نوروتروفین در هیپوکامپ را فعال کنند [۱۱]. آستروسیت‌ها به عنوان یکی از مهم ترین سلول‌های حمایت کننده در CNS، آگروزوم‌هایی با اجزای مختلف در شرایط مختلف ترشح می‌کنند. اثرات آگروزوم‌های مشتق شده از آستروسیت بر نورون‌ها به فرایندهای بیولوژیکی و پاتولوژیک در CNS مربوط می‌شود. طبق یک مطالعه اخیر، وزیکول‌های خارج سلولی کوچک مشتق از آستروسیت، تشکیل سیناپس را از طریق سیگنال‌دهی $TGF-\beta$ با واسطه فیولین-۲ ترویج می‌کنند. علاوه بر این، این آگروزوم‌ها عملکردهای بیولوژیکی مختلفی را در بیماری‌های مختلف CNS انجام می‌دهد [۱۲]. هدف از این مطالعه استخراج آگروزوم‌ها از محیط کشت NSCs و آستروسیت با استفاده از کیت شیمیایی، شناسایی و مقایسه آنها می‌باشد.

روش کار

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی دکتری است که دارای تاییدیه اخلاقی با کد IR.SCU.RES.1403.071 می باشد.

استخراج سلول های بنیادی عصبی و آستروسیت

در این پژوهش نوزاد ۳-۱ روزه موش صحرایی از مرکز تکثیر جندی شاپور تهیه شد. سپس به روش آسان کشتی توسط کلروفرم کشته شد و سر حیوان جدا شد. پس از شکاف جمجمه در شرایط استریل، مغز حیوان جدا و به قطعات کوچک تقسیم شده و به منظور هضم اتصالات بین سلول ها، به مدت ۲۰ دقیقه در آنزیم تریپسین ۰/۲۵% (Gibco) در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از آن از صافی مش عبور داده شده و محلول حاصل با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت پلت سلولی حاصل در فلاسک حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰% سرم جنین گاو (FBS) کشت داده شد. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول ها، به منظور جداسازی توده های سلولی NSCs، محیط رویی از فلاسک سلولی برداشته شد و در فلاسک جداگانه کشت داده شد [۱۳].

تایید سلول های استخراج شده با استفاده از ایمونوسیتوشیمی
به جهت تایید نشانگرهای NSCs (Nestin و Tuj-1) و آستروسیت (GFAP) از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. ابتدا سلول های کشت شده با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. با افزودن محلول تریتون (۰/۵ درصد، به مدت ۵ دقیقه) سلول ها نفوذ پذیر شدند. پس از افزودن آنتی بادی اولیه (GFAP, Nestin و Tuj-1) (Abcam, Santa cruz)، پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در روز دوم، پس از حذف آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه اضافه شد و پلیت به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. سپس هسته های سلولی با استفاده از رنگ ۶،۴-diamidino-2-phenylindole با استفاده از رنگ آمیزی شدند و برای مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus، BX51، ژاپن) آماده شدند [۱۴].

استخراج نانوزیکول های اگزوزوم

استخراج اگزوزوم ها مطابق با دستورالعمل کیت آناسل انجام شد. پس از اینکه فلاسک محتوی NSCs و آستروسیت به پاساژ سوم رسید، محیط کشت فلاسک هر ۷۲ ساعت یکبار برداشته شد و به منظور جداسازی قطعات درشت، سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی فیلتر شد و به همراه معرف A کیت، مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه شد. سپس به منظور جداسازی اگزوزوم ها، محلول حاصل به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ rpm) شد. به منظور افزایش ماندگاری پلت حاصل از سانتریفیوژ (اگزوزوم ها)، معرف B اضافه شد. تمامی مراحل استخراج اگزوزوم مطابق با دستورالعمل کیت شرکت آناسل انجام شد.

تایید مارکرهای سطح اگزوزوم ها با استفاده از وسترن بلات

پروتئین کل از اگزوزوم با استفاده از بافر RIPA (Assay Radioimmuno-Precipitation) استخراج شد و توسط ژل PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel) (Electrophoresis) جداسازی شد. سپس لکه ها به غشای نیتروسلولزی منتقل شدند و با انکوبه کردن غشاء در محلول مسدود کننده به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق، مهار واکنش های غیر اختصاصی انجام شد. پس از آن، غشا با یک آنتی بادی اختصاصی علیه ترانسپانین های CD9، CD63 و CD81 (Santa Crus Company) به مدت ۵ ساعت و یک آنتی بادی ثانویه متصل HRP (horseradish peroxidase) به مدت یک ساعت انکوبه شد. لکه ها با استفاده از کیت ECL (Enhanced chemiluminescence) تشخیص داده شدند [۱۵].

سنجش قطر اگزوزوم ها با استفاده از Dynamic Light

Scatterin (DLS)

اندازه گیری قطر ذرات در محدوده ۱ نانومتر تا ۶ میکرومتر با استفاده از پراکندگی دینامیکی نور (DLS) اندازه گیری می شود. بدین منظور اگزوزوم های استخراج شده با افزودن PBS به حجم ۳۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس قطر اگزوزوم ها با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano ZS (ساخت آمریکا) اندازه گیری شد [۱۶].

تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی آگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه جهت مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، ابتدا یک قطره از سوسپانسیون آگزوزوم را روی شبکه ای با پوشش کربن قرار داده و پس از خشک شدن در دمای اتاق، با PBS استریل شسته و با یورانیل استات ۱٪ به مدت ۱ دقیقه انکوبه شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (مدل ۹۰۰۶E، شرکت LEO) تصویر برداری شد [۱۷].

اندازه‌گیری غلظت آگزوزوم‌ها با استفاده از تست بردفورد

به منظور سنجش میزان پروتئین استخراج شده در محلول حاصل حاوی آگزوزوم، از پروتئین سنجی به روش بردفورد استفاده شد. بدین منظور ۶۰ میکرولیتر از محلول آگزوزوم در پلیت ریخته شد و به ترتیب ۴۰ میکرولیتر آب مقطر و محلول بردفورد به هر چاهک اضافه شد. یک نمونه هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس خوانش OD توسط دستگاه الیزا ریدر (Bio tek) در طول موج ۵۹۵ انجام شد [۱۸].

نتایج

بررسی مورفولوژی سلول‌های آستروسیت و NSCs

تشکیل توده‌های نوروسفر که حاصل تجمع NSCs هستند و وجود ضمامن ستاره‌ای شکل که از جمله ویژگی‌های سلول‌های آستروسیت است در تصاویر تهیه شده از سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس به خوبی نشان داده شد. در ابتدای کشت، NSCs در کنار هم تجمع می‌یابند و توده‌هایی ایجاد می‌کنند که برخلاف سلول‌های آستروسیت به کف فلاسک نمی‌چسبند و حالت شناور دارند. به مرور، در صورت وجود فاکتورهای رشد کافی در محیط کشت، NSCs تکثیر شده و از حالت توده ای شکل خارج می‌شوند. زوائد سلولی کشیده شده و با NSCsهای مجاور سیناپس برقرار می‌کنند (تصویر ۱-ا و ۱-ب). وجود زوائد بلند، نازک و منشعب، ظاهری ستاره ای شکل به آستروسیت‌ها می‌دهد. در ابتدای کشت که تعداد سلول‌ها کم است، به جهت برقراری ارتباط میان سلول‌ها، زوائد، رشد زیادی دارند ولی

بتدریج که تراکم سلولی افزایش یافت، فضای بین سلول‌ها کمتر شده، زوائد کوتاه تر شده و ظاهر ستاره ای شکل سلول‌ها به خوبی نمایان می‌شود (تصویر ۲-ا و ۲-ب).

بررسی مارکرهای سلول‌های NSCs و آستروسیت با استفاده از ایمونوسیتوشیمی

بیان مارکرهای Nestin، Tuj-1 (تصویر ۱-ا و ۱-د و ۱-ف و ۱-ج) و GFAP (تصویر ۲-ا و ۲-د) با استفاده از ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد که به ترتیب تایید کننده هویت سلول‌های استخراج شده NSCs و آستروسیت بود.

نتایج بررسی فراساختار آگزوزوم‌های استخراج شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره

همانگونه که در تصویر ۳ نشان داده شده است، تصاویر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره علاوه بر نشان دادن محدوده قطر آگزوزوم‌ها در محدوده نانو، نشان دهنده یکنواختی و ظاهر فنجانی این نانوزیکول‌ها بود.

تایید آگزوزوم‌های استخراج شده با استفاده از تکنیک وسترن بلات، DLS

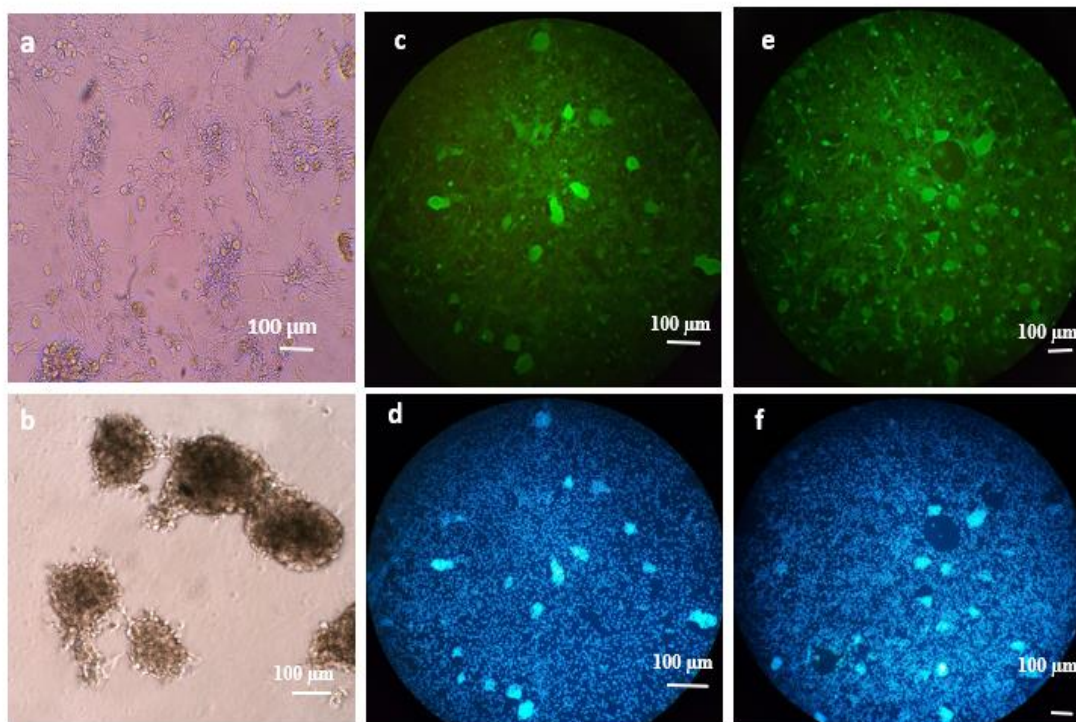
غلظت آگزوزوم‌های استخراج شده توسط بردفورد ارزیابی شد، این غلظت به ترتیب برای آگزوزوم‌های استخراج شده از NSCs و آستروسیت‌ها معادل ۳۳۰/۵۲ و ۴۵۴/۱۹ میکروگرم/میلی لیتر بود. حضور سه مارکر CD9، CD63، CD81 توسط تست وسترن بلات تایید شده و نشانگر این است که نانوزیکول‌های استخراج شده آگزوزوم هستند. میانگین قطر آگزوزوم‌های استخراج شده از NSCs و آستروسیت با استفاده از DLS، به ترتیب ۵۰/۴۵ و ۳۸/۶۱ نانومتر بود (تصویر ۴).

بحث

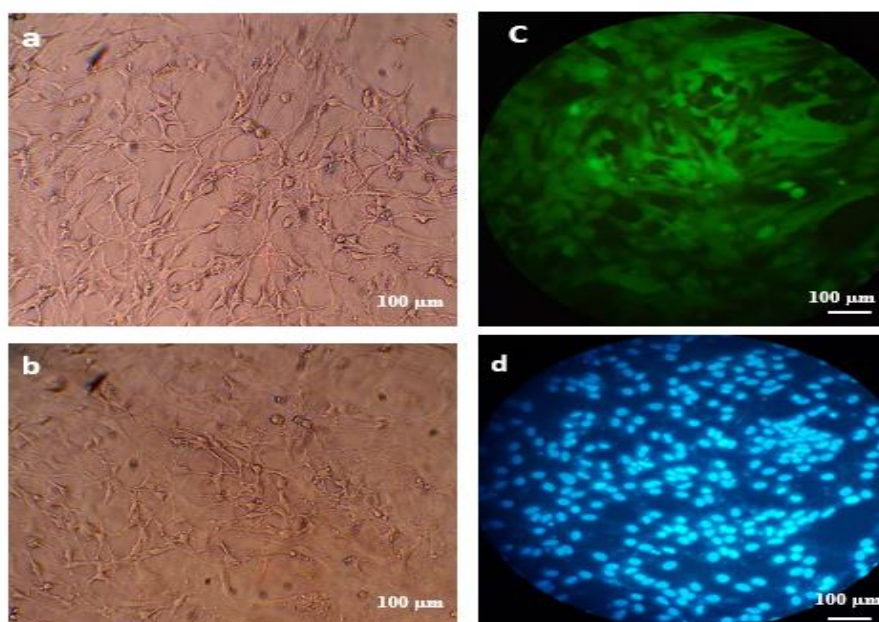
در مطالعه حاضر ابتدا NSCs و آستروسیت‌ها از مغز نوزاد موش ۱-۳ روزه جداسازی و کشت داده شد. به منظور خالص سازی سلول‌ها، پس از اینکه سلول‌ها به پاساژ سوم رسیدند، مارکرهای سطح سلول به کمک تکنیک ایمونوسیتوشیمی شناسایی شده و هویت آن‌ها تایید شد. Nestin و Tuj-1 از جمله مارکرهای عصبی

مراحل اولیه تمایز عصبی می باشد [۲۰]. GFAP نوعی رشته اسکلت سلولی میانی است که عمدتاً در آستروسیت ها یافت می شود و شکل سلولی، ساختار سیستم عصبی مرکزی، عملکرد سیناپسی و ثبات مکانیکی را حفظ می کند [۲۱].

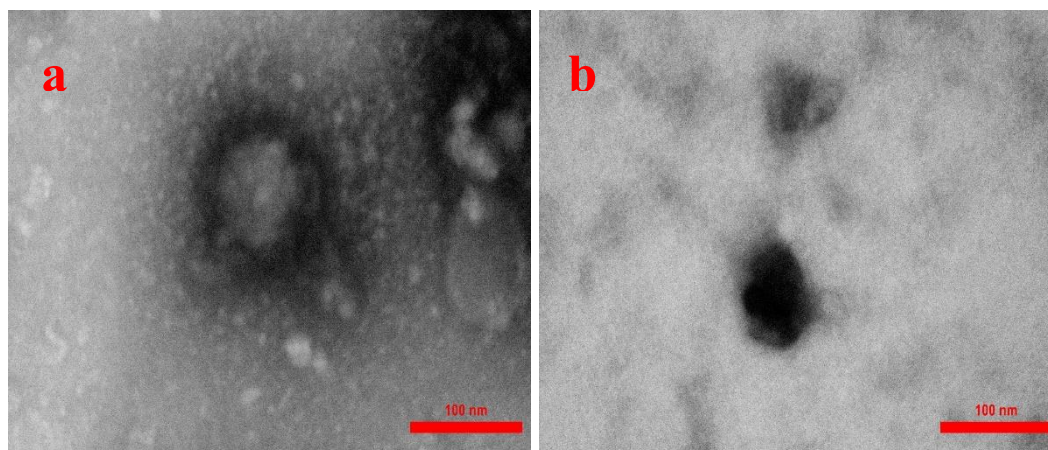
هستند که حضور آن ها در سطح سلول های استخراج شده تایید شد. مارکر Nestin یک پروتئین اسکلت سلولی است که در NSC های مغز در حال رشد و بالغ مشاهده می شود [۱۹]. مارکر Tuj-1 نشانگر نورون ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در



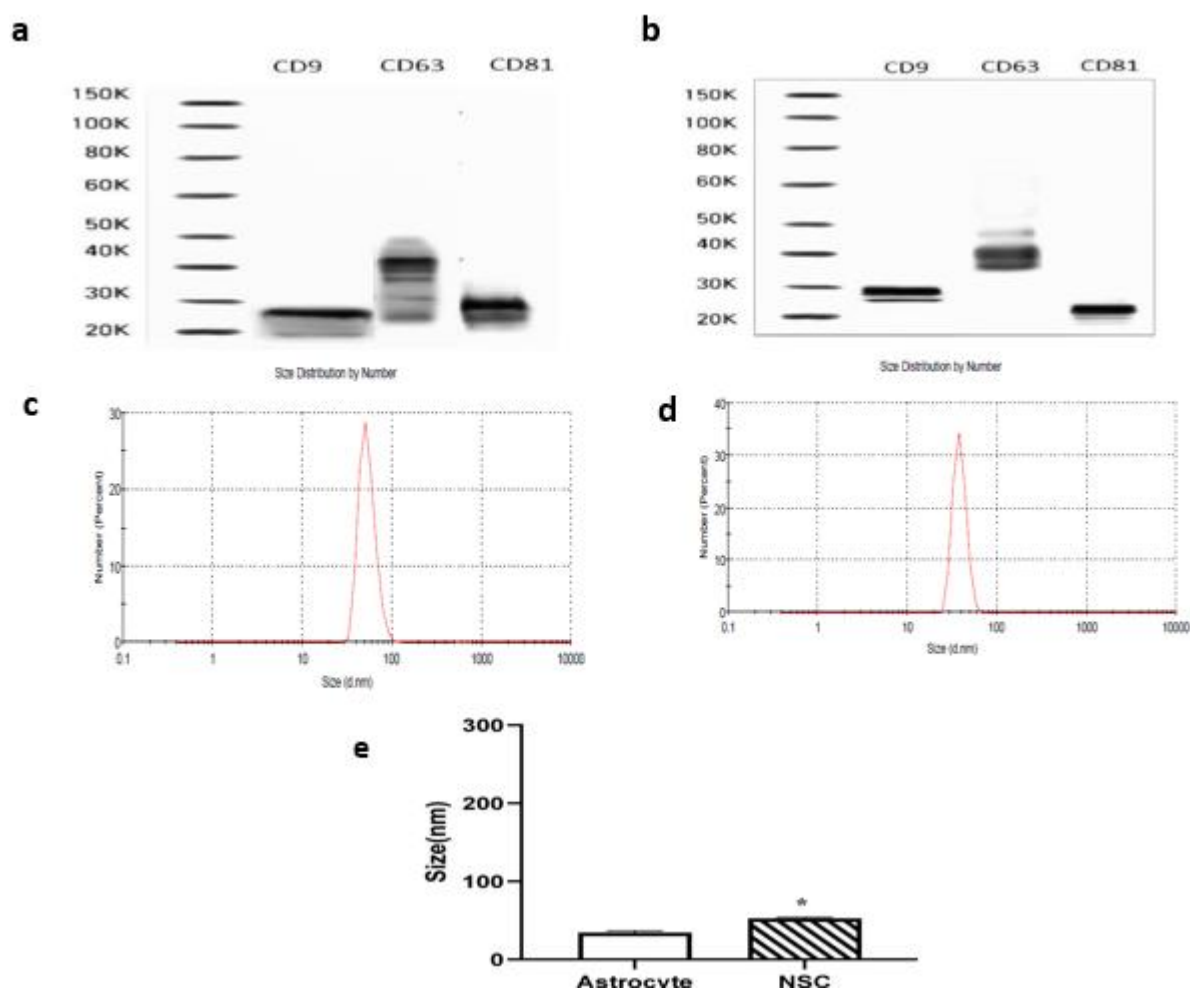
تصویر ۱: تصاویر (a) سلول های بنیادی عصبی و (b) نوروسفر با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز معکوس. تصاویر تایید نشانگرهای Nestin (c) و Tuj1 (e) به همراه (d و f) رنگ آمیزی DAPI با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. (بزرگنمایی ۱۰۰ میکرومتر)



تصویر ۲: تصاویر (a و b) سلول های آستروسیت با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز معکوس (بزرگنمایی ۴ و ۱۰). تصاویر (c) تایید نشانگر GFAP و (b) رنگ آمیزی DAPI با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (بزرگنمایی ۱۰۰ میکرومتر).



تصویر ۳: تصاویر تهیه شده از آگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های (a) بنیادی عصبی و (b) آستروسیت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره.



تصویر ۴: نتایج حاصل از بیان نشانگرهای CD (CD9, CD63, CD81) در آگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های (a) بنیادی عصبی و آستروسیت توسط تکنیک وسترن بلات. نمودارهای حاصل از DLS به جهت تایید نانوذره بودن آگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های (a) بنیادی عصبی و (d) آستروسیت. (e) مقایسه ی قطر آگزوزوم ها (* $p<0.05$).

به منظور تایید هویت نانوزیکول‌های استخراج شده از تکنیک وسترن بلات، DLS و TEM استفاده شد. حضور مارک‌های

همچنین در این مطالعه آگزوزوم‌ها از محیط کشت NSCs و آستروسیت‌ها با استفاده از کیت جداسازی شد. پس از جداسازی

بزرگ‌تر و کوچک‌تر، و تأثیر پارامترهای دستگاه مواجهه است. بنابراین، استفاده از سایر تکنیک‌های مانند انواع تصویربرداری، تحلیل‌های بیولوژیکی و یا NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) پیشنهاد می‌گردد [۲۹].

اگزوزوم‌ها به دلیل مقیاس نانو خود به راحتی می‌توانند از BBB عبور کرده و علاوه بر نقش درمانی خود می‌توانند به عنوان حامل دارو عمل کرده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مغزی نقش مهمی را ایفا کنند. تحقیقات نشان داده است که اگزوزوم‌های استخراج شده از NSC‌ها به دلیل وجود miRNAهای خاص می‌توانند تمایز NSC را در شرایط آزمایشگاهی افزایش داده و همچنین به سبب اثرات ضد التهابی، نورونیک و نوروتروفیک و تعامل با ریزمحیط بافت مغز، برای درمان چندین بیماری عصبی مفید هستند [۲۹].

در تصاویر بدست آمده از TEM نیز حضور اگزوزوم‌ها تایید شد. همانطور که در تصاویر نشان داده شد، از آنجایی که اگزوزوم‌ها منشاء سلولی دارند، غشای اگزوزوم‌ها مشابه با غشای سلول دولاویه ای است. وجود غشای دولاویه ای منشاء گرفته از سلول به توانایی عبور این نانوزیکول‌ها از BBB و همینطور قدرت نفوذ بالا به سلول‌های هدف کمک می‌کند. مشابه با نتایج ما، نتایج حاصل از TEM اگزوزوم‌های استخراج شده از NSC در مطالعه Spinelli و همکاران (۲۰۲۰)، شکل فنجان‌ی معمولی و توزیع اندازه با پیک متوسط در ۱۰۰ نانومتر را نشان داد [۱۱]. در مطالعه Attili و همکاران (۲۰۲۰) نیز شکل فنجان‌ی اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های آستروسیت تایید شد [۴]. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً اگزوزوم‌ها از نظر شکل ظاهری تفاوت ویژه‌ای با یکدیگر ندارند.

نتایج حاصل از سنجش پروتئین به روش بردفورد نشان داد که محلول استخراج شده محتوی اگزوزوم NSCs و آستروسیت به ترتیب محتوی ۳۳۰/۵۲ و ۴۵۴/۱۹ میکروگرم/ میلی لیتر پروتئین است. بنابراین مقدار پروتئین استخراج شده از محیط کشت سلول‌های آستروسیت در محلولی با حجم یکسان نسبت به NSCs به طور معنی داری بیشتر بود. اگزوزوم‌های مشتق شده از گلیا (GDEs) می‌توانند پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها را انتقال دهند و اثرات محافظتی روی سیستم عصبی داشته باشند. GDE‌ها ارتباط گلیا-نورون، پاسخ‌های ضد استرس، ضد التهاب و رشد نیوریت

تراسپانین (CD9, CD63, CD81)، در نتایج حاصل از تکنیک وسترن بلات، تایید کرد که نانوزیکول‌های استخراج شده اگزوزوم هستند. مشابه با نتایج ما، در مطالعه Long و همکاران (۲۰۲۰)، حضور مارکرهای CD9 و CD63 در تست وسترن اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های آستروسیت تایید شد. همچنین در کار Zhang و همکاران (۲۰۲۱)، تایید سه مارکر CD9, CD63 و CD81 در اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های آستروسیت با استفاده از وسترن بلات تایید شد [۲۲]. در مطالعه Ma و همکاران (۲۰۱۹) نیز حضور مارکرهای CD9 و CD63 در اگزوزوم‌های استخراج شده از NSC‌های ناحیه قشر مغز با استفاده از تکنیک وسترن بلات تایید شد [۲۴]. نشانگرهای شناسایی اگزوزوم‌ها شامل Alix، flotillin-1، CD9, CD63 و CD81 می‌باشند. تراسپانین‌ها، به عنوان مهمترین نشانگرهای سطحی که معمولاً در میکرووزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها یافت می‌شوند، یک بررسی قابل اطمینان برای تحقیقات زیستی در رابطه با اگزوزوم‌ها هستند [۲۵]. همچنین وسترن بلات با سادگی، در دسترس بودن و توانایی تشخیص هر دو پروتئین سطحی و داخلی اگزوزومی، یک رویکرد قابل اعتماد برای شناسایی پروتئین‌های هدف مرتبط با اگزوزوم‌ها ارائه می‌دهد و استفاده گسترده از آن در تحقیقات اگزوزومی بر اهمیت و قابل اطمینان بودن آن تأکید دارد [۲۶].

نتایج حاصل از DLS نشان داد که حدود ۹۹/۹ درصد از وزیکول‌های استخراج شده از محیط کشت NSCs و آستروسیت به ترتیب قطری حدود ۵۰/۴۵ و ۳۸/۶۱ نانومتر دارند. این نتایج حاکی از آن است که وزیکول‌های استخراج شده در محدوده نانو قرار دارند و مطابق با مطالعات انجام شده در گذشته، این نانوزیکول‌ها، در دسته ی اگزوزوم‌ها جای دارند. در مطالعه Derkus و همکاران (۲۰۲۲)، نیز میانگین قطر اگزوزوم‌های استخراج شده از NSC‌ها در ناحیه تحت بطنی، ۸۰ نانومتر بود [۲۷]. در نتایج حاصل از مطالعه Sampedro و همکاران (۲۰۲۴)، محدوده قطر اگزوزوم‌های استخراج شده از آستروسیت‌ها ۲۵۰-۵۰ نانومتر بود. [۲۸] و این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه ما مطابقت داشت. شایان ذکر است روش DLS در اندازه‌گیری قطر اگزوزوم‌ها با محدودیت‌هایی مانند حساسیت به ناخالصی‌ها و ذرات تجمع‌یافته، عدم توانایی در تفکیک ذرات

آگروزوم‌های استخراج شده از آستروسیت‌ها به سبب مقدار پروتئین بیشتر و اندازه کوچکتر نسبت به آگروزوم‌های استخراج شده از سلول‌های بنیادی عصبی نقش موثر تری در درمان بیماری‌ها داشته باشند.

این پژوهش با هدف استخراج، تایید و مقایسه آگروزوم‌های استخراج شده از NSC و آستروسیت‌ها انجام شد. آگروزوم‌ها به سبب منشأ زیستی و حمل اطلاعات ژنتیکی و انتقال آن میان سلول‌ها، قابلیت حمل داروها و مقیاس نانو خود نسبت به سلول درمانی به جهت درمان بیماری‌ها از اولویت بالاتری برخوردار هستند. بنابراین تحقیقات در رابطه با آگروزوم‌ها و مکانیسم‌های عملکرد آن‌ها به خصوص در حوزه پزشکی و بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی می‌تواند آینده‌ای امیدبخش داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل کار پژوهشی در مقطع دکتری فیزیولوژی جانوری در قالب پایان‌نامه می‌باشد. بدین وسیله از مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

- [1] Marei, H.E., et al., *Human olfactory bulb neural stem cells expressing hNGF restore cognitive deficit in Alzheimer's disease rat model*. Journal of cellular physiology, 2015. **230**(1): p. 116-130.
- [2] Valenza, M., et al., *Alternative targets to fight Alzheimer's disease: focus on astrocytes*. Biomolecules, 2021. **11**(4): p. 600.
- [3] Upadhyay, R., et al., *Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders*. Journal of controlled release, 2020. **323**: p. 225-239.
- [4] Attili, D., et al., *Astrocyte-derived exosomes in an iPSC model of bipolar disorder*. Neurodevelopmental disorders: Employing iPSC technologies to define and treat childhood brain diseases, 2020: p. 219-235.
- [5] Cai, Z.-Y., et al., *Exosomes: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease?* Neural regeneration research, 2018. **13**(5): p. 930-935.

را تقویت می‌کنند و همچنین ممکن است در بیماری‌های عصبی مانند گلیوما، گلیوبلاستوما، بیماری آلزایمر، پارکینسون و عفونت‌های عصبی نقش داشته باشند. آنها همچنین می‌توانند از BBB عبور کرده و وارد گردش خون شوند، بنابراین بر عملکرد سایر اندام‌ها تأثیر می‌گذارند [۳۰]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که تزریق درون وریدی آگروزوم‌های مشتق از NSCs انسان در موش‌های مدل آلزایمر 5xFAD باعث کاهش تجمع پلاک آمیلوئید بتا و فعال‌سازی میکروگلیال شد. این نتایج با ترمیم نسبی سطوح هموستاتیک سیتوکین‌های پیش التهابی در حال گردش در موش‌های مدل آلزایمری مرتبط است [۳۱]. درمان با نانو وزیکول‌ها از آسیب سیناپسی در مغز مدل آلزایمری محافظت می‌کند که موجب بهبود علائم شناختی می‌شود. آگروزوم‌های آزاد شده توسط آستروسیت‌ها حاوی مواد محافظت کننده عصبی از جمله فاکتور رشد فیبروبلاست-۲، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و آپولیپوپروتئین-D هستند [۳]. به خوبی مشخص شده است که آگروزوم‌های رها شده از سلول‌های آستروسیت در شرایط کشت خاص حامل miRNA یا پروتئین‌های خاص هستند که می‌توانند نویدبخش درمان آسیب‌های مغزی و بیماری‌های تخریب کننده عصبی باشند. آنزیم آلدولاز C در آگروزوم‌های آزاد شده از آستروسیت‌ها، مسیر Wnt را با تشکیل کمپلکس با اکسین در نورون‌ها فعال می‌کند. تحریک مسیر سیگنال دهی Wnt با لیگاند Wnt5a منجر به تغییراتی در miRNA-26a-5p در نورون‌های هیپوکامپ می‌شود که باعث افزایش تکثیر و چگالی دندردیتی می‌شود [۳۲].

نتیجه گیری

پژوهش حاضر به جداسازی و شناسایی آگروزوم‌ها از NSCs و آستروسیت‌ها پرداخته است. نتایج نشان می‌دهند که مراحل استخراج و تأیید هویت آگروزوم‌ها با استفاده از کیت تجاری با موفقیت انجام شده است. منشأ زیستی و اندازه کوچک آگروزوم‌ها که موجب سهولت عبور آن‌ها از BBB می‌شود موجب شده تا استفاده از این نانوزیکول‌ها نسبت به سلول درمانی و دارو درمانی راهکاری مورد اطمینان تر به جهت درمان بیماری‌ها ارائه دهد. طبق نتایج بدست آمده از مقایسه آگروزوم‌های استخراج شده از NSCs و آستروسیت این احتمال وجود دارد که

- [6] Zou, Y., et al., *Review on the roles of specific cell-derived exosomes in Alzheimer's disease*. *Frontiers in Neuroscience*, 2022. **16**: p. 936760.
- [7] Cai, Z.-Y., et al., *Exosomes: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease?* 2018. **13**(5): p. 930-935.
- [8] You, Y., et al., *Human neural cell type-specific extracellular vesicle proteome defines disease-related molecules associated with activated astrocytes in Alzheimer's disease brain*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022. **11**(1): p. e12183.
- [9] Xiao, T., et al., *The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Translational neurodegeneration*, 2017. **6**: p. 1-6.
- [10] Fayazi, N., et al., *Stem cell-derived exosomes: a new strategy of neurodegenerative disease treatment*. *Molecular neurobiology*, 2021. **58**: p. 3494-3514.
- [11] Spinelli, M., et al., *Neural stem cell-derived exosomes revert HFD-dependent memory impairment via CREB-BDNF signalling*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(23): p. 8994.
- [12] Xu, H., et al., *The functions of exosomes targeting astrocytes and astrocyte-derived exosomes targeting other cell types*. *Neural Regeneration Research*, 2024. **19**(9): p. 1947-1953.
- [13] Buenaventura, R.G., et al., *Sequential isolation of microglia and astrocytes from young and aged adult mouse brains for downstream Transcriptomic analysis*. *Methods and Protocols*, 2022. **5**(5): p. 77.
- [14] Hoveizi, E. and S. Tavakol, *Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells derived beta cell precursors on a nanofibrous scaffold: an approach to treat diabetes mellitus*. *Journal of Cellular Physiology*, 2019. **234**(7): p. 10196-10204.
- [15] Wei, X., et al., *Surface phosphatidylserine is responsible for the internalization on microvesicles derived from hypoxia-induced human bone marrow mesenchymal stem cells into human endothelial cells*. *PloS one*, 2016. **11**(1): p. e0147360.
- [16] Mahmoudi, M., et al., *Comparison of the effects of adipose tissue mesenchymal stromal cell-derived exosomes with conditioned media on neutrophil function and apoptosis*. *International immunopharmacology*, 2019. **74**: p. 105689.
- [17] Jung, M.K. and J.Y. Mun, *Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2018(131): p. 56482.
- [18] Wang, J., et al., *Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods*. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015. **8**(6): p. 6135.
- [19] Bernal, A. and L. Arranz, *Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018. **75**: p. 2177-2195.
- [20] Ying, C., et al., *Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2012. **32**: p. 1255-1263.
- [21] Ye, Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression*. *Neuroscience letters*, 2011. **503**(1): p. 15-19.
- [22] Zhang, W., et al., *Astrocyte-derived exosomes protect hippocampal neurons after traumatic brain injury by suppressing mitochondrial oxidative stress and apoptosis*. *Aging (Albany NY)*, 2021. **13**(17): p. 21642.
- [23] Long, X., et al., *Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury*. *Journal of neuroinflammation*, 2020. **17**: p. 1-15.
- [24] Ma, K., et al., *Insulin-like growth factor-1 enhances neuroprotective effects of neural stem cell exosomes after spinal cord injury via an miR-219a-2-3p/YY1 mechanism*. *Aging (Albany NY)*, 2019. **11**(24): p. 12278.
- [25] Guo, M., et al., *Mesenchymal stem cell-derived exosome: a promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease*. *Alzheimer's research & therapy*, 2020. **12**: p. 1-14.
- [26] Li, J., et al., *Highly Sensitive Exosome Detection for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer Using Immunoassay Based on Hierarchical Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate*. *Small Methods*, 2022. **6**(6): p. 2200154.
- [27] Derkus, B., et al., *Xenogenic neural stem cell-derived extracellular nanovesicles modulate human mesenchymal stem cell fate and reconstruct metabolomic structure*. *Advanced Biology*, 2022. **6**(6): p. 21013.
- [28] Gordillo-Sampedro, S., et al., *iPSC-derived healthy human astrocytes selectively load miRNAs targeting neuronal genes into extracellular vesicles*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2024. **129**: p. 103933.
- [29] Zhang, R., et al., *NSC-derived exosomes enhance therapeutic effects of NSC*

- transplantation on cerebral ischemia in mice.* Elife, 2023. **12**: p. e84493.
- [30] Li, H., et al., *Glia-derived exosomes: Promising therapeutic targets.* Life sciences, 2019. **239**: p. 116951.
- [31] Apodaca, L.A., et al., *Human neural stem cell-derived extracellular vesicles mitigate hallmarks of Alzheimer's disease.* Alzheimer's Research & Therapy, 2021. **13**: p. 1-18.
- [32] Luarte, A., et al., *Astrocyte-derived small extracellular vesicles regulate dendritic complexity through miR²¹-a-5p activity.* Cells, 2020. **9**(4): p. 930.