تأثیر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر جهت گیری پاسخ ایمنی لنفوسیت‌های T کمکی و سیمای بالینی انسفالومیلیت آلرژیک تجربی خودایمن

آرام مکاری زاده*[۱]، دکتر نوروز دلیرژ[۲]، احمد مرشدی[۳]، دکتر امیرعباس فرشید[٤]، قاسم مسیبی[٥]

تاریخ دریافت: 90/11/18 تاریخ پذیرش: 91/1/25

چکیده

پیش زمینه و هدف: انسفالومیلیت تجربی خودایمن به عنوان مدل حیوانی بیماری Multiple Sclerosis، محور بسیاری از تحقیقات مربوط به این بیماری قرار گرفته است. رهیافت‌های معمول در درمان این بیماری عمدتاً شامل القاء تحمل ایمنی و یا شیفت پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های خود واکنشگر زیر رده TH17,TH1 به زیر رده TH2 است. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی کارایی درمانی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مهار پاسخ‌های التهابی لنفوسیت های خود واکنشگر زیر رده‌های TH17،TH1 و تخفیف شدت علائم بالینی بیماری است.

مواد و روش کار: متعاقب القاء بیماری در موش‌های C57BL/6 ماده و ظهور علائم بیماری، موش‌ها در سه گروه مجزا، تحت سه تزریق وریدی به فاصله یک هفته با بافر فسفات سالین، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (۵×۱۰^{۵} سلول) و اگزوزوم‌های مشتق از آن (۵۰µg) قرار گرفتند. علائم بالینی بیماری به صورت روزانه ثبت گردید. سه هفته پس از بروز علائم بیماری، موش‌ها تشریح گردیده و لنفوسیت‌های طحالی آن‌ها در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌ها جهت بررسی تغییرات پروفایل سایتوکاینی (IFN-γ ,IL-17، IL-10، TGF-β1) به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون (MTT) 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)، جهت بررسی تأثیر مهاری اگزوزوم‌ها بر تکثیر آنتی ژنیک لنفوسیتی انجام پذیرفت.

یافته‌ها: داده‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌های مشتق از آن، از طریق کاهش ترشح سایتوکاین های التهابی IL-17, IFN-γ، افزایش ترشح سایتوکاین های ضد التهابی (IL-10 ,TGF-β1 ($p<0.001$)و مهار تکثیر آنتی ژنیک در لنفوسیت‌های T خود واکنشگر ($p<0.001$)، قادر به تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری می‌باشند.

بحث و نتیجه گیری: پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد درمانی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های مزانشیمال می‌تواند به عنوان یک روش درمان غیر سلولی در درمان بیماری‌های خودایمن مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن، لنفوسیت خود واکنشگر، TH17،TH1، سلول بنیادی مزانشیمال، اگزوزوم

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره دوم، ص ۲۰۱-۱۹۱، خرداد و تیر ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۹۱۲۶۴۰۸۹۳۳

Email: aramm79@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمال[۱] به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز تعریف می‌شوند که جمعیت هتروژن بسیار کوچکی شامل ۰.۰۰۱- ۰.۰۰۰۱ درصد از کل سلول‌های هسته دار مغز استخوان را تشکیل می‌دهند (۱). امروزه استفاده درمانی از این سلول‌ها، به دلیل دارا بودن پتانسیل‌های بالقوه سرکوب ایمنی و ترمیمی در درمان بیماری‌های خود ایمن نظیر بیماری مالتیپل اسکلروزیس، آرتریت روماتوئید و دیابت نوع I کاربرد ویژه‌ای پیدا کرده است. فاکتورهای سرکوب ایمنی این سلول‌ها عمدتاً مربوط به مجموعه مولکول‌های مهاری بیان شده در سطح سلول (PD-L1، TGF-β، HLA-G، Galectins)، تولید یک سری سایتوکاین‌های ضد التهابی (IL-10,TGF-β)، آنزیم‌های مهارکننده

[۱] دانشجوی دکترا، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[۲] استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۳] دانشیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٤] دانشیار بخش پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٥] دانشیار بخش میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

(ماتریکس متالوپروتئینازها) و متابولیت‌ها (PGE2 ,IDO,NO) است که به صورت پاراکرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول عملکرد مهاری خود را بر جای می‌گذارند (۳،۲) .شواهد حاصل از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که بسیاری از اثرات پاراکرین سلول‌های بنیادی مزانشیمال به واسطه آزاد سازی وزیکل‌های کوچک به قطر ۱۵۰-۵۰ نانومتر صورت می‌پذیرد که اگزوزوم[1] نامیده می‌شوند (۷-۳).

اگزوزوم‌ها وزیکل های کوچکی هستند که از غشاء سلول منشأ می‌گیرند و در ریز محیط اطراف سلول آزاد می‌شوند. این وزیکل ها حامل یک مجموعه انتخابی از مجموعه لیگاند/ رسپتور، محتویات آنزیمی، سایتوکاینی و مواد ژنتیکی سلول مادر می‌باشند که متعاقب اتصال و اینترنالیزه شدن به داخل سلول هدف، منجر به ارسال پیام‌های تحریکی یا مهاری، برنامه ریزی مجدد ژنتیکی و تغییر فنوتیپی در سلول‌های هدف می‌شوند (۱۰-۸). استفاده درمانی از اگزوزوم‌ها به عنوان یک روش درمان غیر سلولی یکسری مزایایی دارد که می‌تواند توجیه مناسبی برای جایگزینی آن در روش‌های معمول سلول درمانی باشد. به طور خلاصه اگزوزوم‌ها در قیاس با سلول به لحاظ ساختاری و عملکردی با ثبات‌تر بوده و قابلیت ذخیره سازی نامحدودتری دارند (۴). بعلاوه پیام دهی تحریکی یا مهاری ناشی از اگزوزوم‌ها در قیاس با سلول به مراتب قوی‌تر بوده (۱۱) و مخاطرات ناشی از بروز ناپایداری ژنتیکی (۱۳، ۱۲، ۴) و رد ایمنی متعاقب تجویز آلوژنیک (۵) را در مدل‌های in vivo ندارند.

انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن به عنوان یک بیماری دمیلینه کننده سیستم اعصاب مرکزی توصیف می‌شود که در نتیجه عبور سلول‌های TCD4 خود واکنشگر از سد خونی- مغزی و پاسخ نابجای آن به آنتی ژن‌های میلینی سیستم اعصاب مرکزی ایجاد می‌شود (۱۵، ۱۴) .در مطالعه حاضر، امکان مهار یا تعدیل پاسخ‌های آسیب‌زای سلول‌های TCD4 خود واکنشگر (زیر رده‌های TH17,TH1) با استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان یک روش جایگزین سلول درمانی مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال

سلول‌های مغز استخوان‌های Tibia و Femur موش‌های ۸-۶ هفته C57Bl/6 ماده، مطابق روش Zappia و همکاران (۱۵) به روش فلاشینگ جداسازی شده و متعاقب دوبار شستشو با PBS[2]، سلول‌ها با غلظت 4×10^5 cell/cm^2 به فلاسک های کشت T75 حاوی محیط کشت DMEM-LG (Gibco– انگلستان) و ۱۰ درصد FBS[3] (Gibco –انگلستان) منتقل شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه و در حضور ۵ درصد گاز CO2 برای مدت ۱۲ ساعت انکوبه شده و متعاقب تعویض مایع رویی کشت، سلول‌های غیر چسبنده حذف گردیده و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار انجام گرفته و پس از اولین Confluency>70% سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین (Sigma-Aldrich- آمریکا) حاوی ۲ درصد EDTA جداسازی گردیده و جهت پاساژ بعدی به فلاسک‌های T25 منتقل گردیدند. نهایتاً از پاساژ سوم سلول‌ها جهت درمان استفاده گردید (۱۵).

بررسی شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمال به روش فلوسایتومتری

سلول‌های MSC به دست آمده در پاساژ سوم کشت سلولی جهت تائید بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش فلوسایتومتری (PAS flow cytometer , Partec GmbH, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند. از مونوکلونال آنتی بادی‌های ضد مارکرهای CD29-FITC و CD73-PE و Sca-1-FITC (eBioscience) به عنوان شاخص‌های مثبت سلول‌های بنیادی و از مونوکلونال آنتی بادی ضد CD45-FITC (eBioscience) به عنوان شاخص منفی این سلول‌ها استفاده گردید (۳).

جداسازی اگزوزوم‌ها به روش سانتریفیوژ تفریقی[4]

اگزوزوم‌ها از مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت DMEM عاری از FBS که حاوی ۵ درصد BSA[5] بود در زمان Confluency بالای ۷۰ درصد به روش سانتریفیوژ تفریقی مطابق روش Thery و همکاران (۱۶) جداسازی گردید (زنده مانی (۹۵%). به طور خلاصه متعاقب سانتریفیوژ مایع رویی کشت سلول با دور ۲۰۰۰g جهت رفع بقایای سلولی و ۱۰۰۰۰g جهت رفع پارتیکل ها، مایع رویی فاقد سلول با دور ۱۰۰۰۰۰ g برای مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شده و پلت به دست آمده پس از شستشو با PBS تحت سانتریفیوژ مجدد با دور ۱۰۰۰۰۰ g برای مدت ۲ ساعت قرار گرفت. پلت نهایی بدست آمده از اگزوزوم‌ها در PBS تعلیق سازی شده و غلظت پروتئینی آن به روش برادفورد تعیین گردید (۱۶).

تایید جداسازی اگزوزوم‌ها

[1] Exosome

[2] Phosphate buffered saline
[3] Fetal bovine serum
[4] Differential centrifugation
[5] Bovine serum albumin

پوشش دادن اگزوزوم‌ها بر روی بید لاتکس بـه روش Thery و همکاران (۱۶) انجام پذیرفت. به طور خلاصه اگزوزوم‌ها بـه همـراه لاتکس بیـدهای آلدئیـد/ سـولفات ۴ میکرومتـری (Invitrogen – انگلستان) برای مدت ۶۰ دقیقـه در دمـای اتـاق انکوبـه گردیدنـد. متعاقباً جهت اتمام واکنش باندینگ، ۱۰۰mM گلایسین (Merck- آلمان) اضافه گردید. بیدهای پوشش داده شده با اگـزوزوم پـس از سه بار شستشو در PBS با استفاده از سانتریفیوژ بـرای مـدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰g، مجدداً در بافر فسفات سالین تعلیق سـازی گردیدند. اگزوزوم‌های پوشش داده شده بر روی بیـدهای لاتکـس، جهـت تائیـد بیـان مارکرهـای اختصاصـی اگـزوزوم بـا اسـتفاده از مونوکلونال آنتی بادی‌های اختصاصی آنتی CD9-FITC و CD81- FITC (eBioscience) (۱۹،۱۸) رنگ آمیـزی شـده و در دسـتگاه فلوسایتومتری بررسی گردیدند.

میکروسکوپ الکترونی

اگزوزوم‌های جداسازی شده به روش سـانتریفیوژ تفریقـی، در بافر فسفات سالین تعلیق سازی شده و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی گرید کت شده با کربن منتقل گردید. رنگ آمیزی نگاتیو با استفاده از ۱۰ میکرولیتر محلول آبی فسـفو تنگسـتنیک اسـید ۱ درصد خنثی انجام پذیرفت. بررسـی‌هـای مربـوط بـه مرفولـوژی و اندازه وزیکل ها با استفاده از میکروسـکوپ الکترونـی ترانسمیشـن (Philips BioTwin, CM100, The Netherlands) در ولتـاژ 80Kv انجام گرفته و عکس‌های میکروگراف تهیه گردید.

آزمون MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

آزمون مهار تکثیر لنفوسـیتی، مطـابق روش Gao و همکـاران (۱۷) انجام پذیرفت. به طور خلاصه لنفوسیت‌های طحالی برداشت شده از موش‌های بیمار پس از شمارش و تعلیق سـازی در محـیط کشـت RPMI حـاوی% ۱۵ FBS (10^5 سـلول در حجـم ۱۰۰ میکرولیتر) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شـده و تحت تیمـار بـا ۵۰µl محـیط کشـت حـاوی سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمال (۱۰۴ سلول) و یا اگزوزوم‌هـای مشـتق از آن (۱۰ µg) قرار گرفتند. جهت تحریک تکثیر آنتی ژنیک از پپتید (۵ µg/ml) MOG_{35-55} اسـتفاده گردیـد. متعاقـب ۷۲ سـاعت انکوباسـیون در دمای 37^0C و غلظت پنج درصد گـاز CO2، ۲۰µl محلـول MTT (۵ میلی گرم در ۱ میلـی لیتـر بـافر فسـفات سـالین) بـه تمـامی چاهک‌ها افزوده شده و مجدداً بـرای مـدت ۴ سـاعت انکوباسـیون گردید. در پایان زمان انکوباسـیون، بـا افـزودن ۱۰۰µl دی متیـل سولفوکسـاید (Sigma-Aldrich – امریکـا) بـه هـر چاهـک و انکوباسـیون آن بـرای مـدت ۱۰ دقیقـه در انکوبـاتور Shaker دار، شدت نور جذب شده در طول موج ۵۲۰ nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. درصد مهار تکثیر لنفوسیتی بـا اسـتفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

Inhibition ratio of cell proliferation: [OD_{520} (Lymphocyte+MOG+MSC or Exosome) – $OD_{520(Lymphocute+MOG)}$]/ [$OD_{520(Lymphocute+MOG)}$ - $OD_{520(MSC\ or\ Exosome+MOG)}$] x100%

القاء بیماری و پروتوکل درمان

موش‌های C57BL/6 ماده ۶ تـا ۸ هفتـه، از انسـتیتو پاسـتور ایران خریداری و در شرایط استاندارد محیطی و غـذایی نگهـداری شدند. تمامی مراحـل تحقیـق مطـابق اصـول بهداشـتی و اخلاقـی پذیرفته شده در کمیته‌هـای اخلاقـی حفـظ و نگهـداری حیوانـات آزمایشگاهی صورت پذیرفت. القاء بیمـاری انسـفالومیلیت آلرژیـک خـودایمن مطـابق روش Pluchino و همکـارانش (۲۰) بـا انـدکی تغییر انجام پذیرفت. به طور خلاصه، مـوش‌هـا تحـت تزریـق زیـر جلدی با ۲۰۰µg پپتید(AnaSpec) MOG_{35-55} امولسیفیه شده در ۱۰۰ µl ادجوانـت فرونـد کامـل (Sigma-Aldrich – امریکـا) در ناحیه پشت قرار گرفتند. متعاقباً تزریق داخل صفاقی ۴۰۰ng سـم سیاه سـرفه(Sigma-Aldrich –امریکـا) رقیـق شـده در ۴۰۰µl فسفات بـافر سـالین، در روز اول تزریـق و ۴۸ سـاعت بعـد انجـام پذیرفت. بلافاصله پس از ظهور علائم بیمـاری، مـوش‌هـا از لحـاظ شدت بیماری و شرایط فیزیکی امتیاز دهـی شـده و جهـت ایجـاد شرایط مساوی با احتسـاب ایـن امتیـاز دهـی در ۳ گـروه) ۷ سـر موش/گروه)تقسیم بندی شدند. در گروه کنترل موش‌ها در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از بروز نخستین علائم بیمـاری تحـت سـه تزریـق داخل وریدی در ورید دمی با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سـالین قرار گرفتند. در گروه درمان (A) موش‌ها تحت سه تزریق در ورید دمی با $5 x10^5$ سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر قـرار گرفتنـد. در گروه (B) موش‌ها تحت سه تزریق در ورید دمی بـا اگـزوزوم‌هـای مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به میزان ۵۰µ g در حجـم ۲۰۰ میکرولیتر قرار گرفتند.

ارزیابی علائم بالینی بیماری به صورت روزانه

به منظور ارزیابی تأثیرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزم های مشتق از آن بر تغییرات شدت علائم بالینی بیماری، تزریق داخل وریدی سلول‌ها (5×10^5) سلول و اگزوزوم‌ها (۵۰ µg) در سه نوبت در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از بروز علائم بیماری انجام پذیرفت. شدت علائم بـالینی بیمـاری بـه صـورت روزانـه بررسـی گردیده و بر اساس سیستم امتیاز دهی ذیل امتیاز دهی گردید.

0) عدم بیماری، ۱) شلی دم، ۲) فلجی دم، ۳) فلجی یـک پـا، ۴) فلجی کامل دو پا، ۵) فلجی دو پا و یک دست، ۶) فلجی چهـار دست و پا،۷) مرگ

سنجش سایتوکاین

سه هفته پس از بروز علائم بیماری، موش‌ها به شیوه انسانی با استفاده از تیوپنتال سدیم کشتار گردیده و سلول‌های طحالی آن‌ها جهت بررسی پروفایل سایتوکاینی جداسازی و کشت گردید. مایع رویی کشت سه روزه سلول‌های طحالی مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال یا اگزوزم های مشتق از آن، در حضور پپتید آنتی ژنیک MOG_{35-55} جهت اندازه گیری مقادیر سایتوکاین های مترشحه IL-10، IL-17، IFN-γ, TGF-β1 جمع آوری و با استفاده از کیت های تجاری الایزا(eBioscience) اندازه گیری گردید.

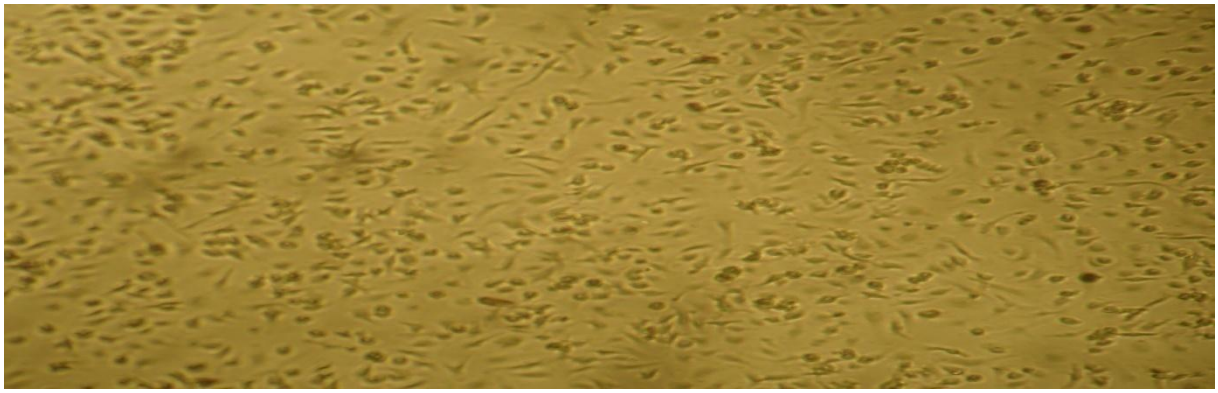
بررسی‌های آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌های آماری مربوط به تغییرات غلظت سایتوکاین ها از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) نرم افزار MINITAB استفاده گردید. به منظور ارزیابی و مقایسه تغییرات شدت علائم درمانگاهی در گروه‌های مختلف درمانی، متعاقب تبدیل داده‌های غیر پارامتریک به داده‌های پارامتریک از روش General Linear Model و اندازه‌های تکراری (Repeated Measure) نرم افزار SPSS ویراست ۱۸ استفاده گردید. در تمامی بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

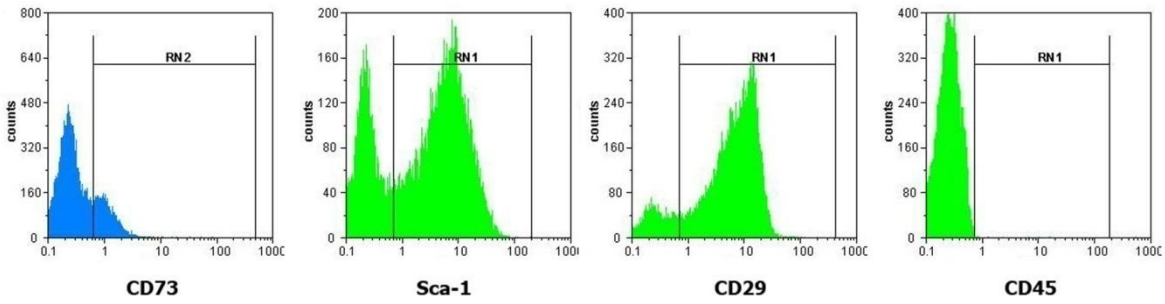
یافته‌ها

-بررسی مارکر های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمال

جمعیت نسبتاً همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال در پاساژ سوم کشت سلولی بدست آمد (شکل ۱). بررسی شاخص‌های سطحی به روش فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بدست آمده، مارکرهای (۸۶.۹۶%)CD29، (۶۸.۵۹%) Sca-1و (۲۱%) CD73 (شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمال) را بیان کرده ولی بیان سطحی مارکر (۰.۱۲%) CD45 (شاخص رده میلوئیدی) منفی تشخیص داده شد (شکل ۲).



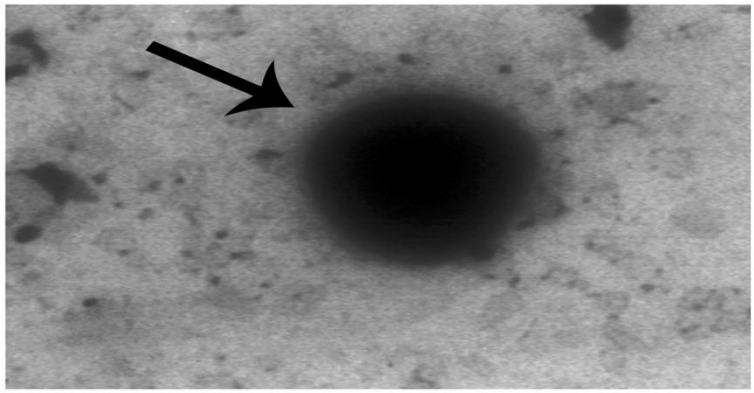
شکل شماره (۱): سلول‌های بنیادی مزانشیمال کشت شده در پاساژ سوم به شکل سلول‌های دوکی و شبیه فیبروبلاست در تصویر دیده می‌شوند.



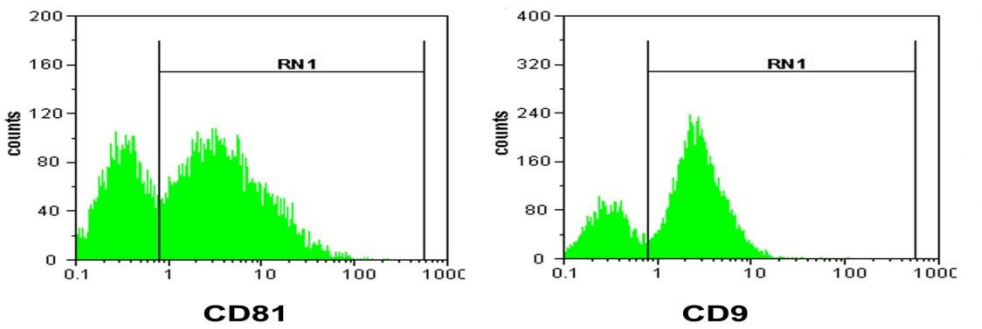
شکل شماره (۲): سلول‌های بدست آمده از پاساژ سوم کشت سلول‌های مغز استخوان موش‌های C57BL/6، جهت تایید بیان مارکرهای سلول بنیادی مزانشیمال با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی‌های اختصاصی رنگ آمیزی شده و به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. بیان سطحی مارکر های CD29،Sca-1 و CD73 به عنوان شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمال در سطح سلول‌ها تایید شد. بیان CD45 به عنوان مارکر رده میلوئیدی، منفی تشخیص داده شد.

-بررسی اگـزوزوم‌هـا بـا اسـتفاده از میکروسـکوپ الکترونـی و فلوسایتومتری

وزیکل های کوچک با مرفولوژی بیضی شکل در میکروگـراف های بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روئیت گردید (شکل ۳). دامنه اندازه وزیکل ها بر اساس کوچک‌ترین و بزرگ‌تـرین وزیکـل دیده شده در میکروگراف های متعدد بین ۲۰۰-۵۰ نانومتر تعیین گردید. با این حال اکثریت عمده وزیکل ها انـدازه‌ای کوچـک‌تـر از ۱۵۰ نـانومتر داشـتند بررسـی شـاخص‌هـای سـطحی بـه روش فلوسیتومتری، بیان سطحی مـارکر هـای CD81, CD9 (شـاخص عمومی اگزوزوم‌ها) را مورد تایید قرار داد (شکل ۴).



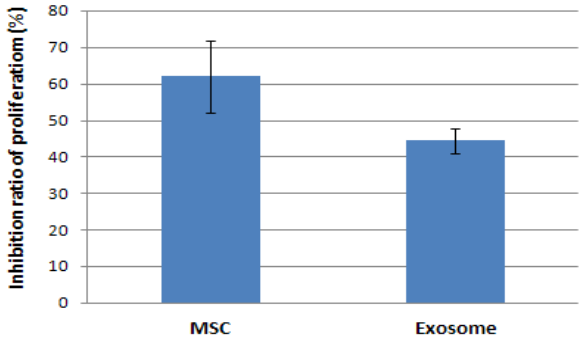
شکل شماره (۳): تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک اگزوزوم جداسازی شده از مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اگزوزوم به شکل یک وزیکل در تصویر دیده می‌شود



شکل شماره (۴): اگزوزوم‌های جداسازی از مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال، جهت بررسی حضور شاخص‌های عمومی اگزوزومی بر روی بیدهای لاتکس منتقل شده و به روش فلوسایتومتری بررسی گردیدند. بیان مارکر های CD9,CD81 بر روی غشاء اگزوزومی به عنوان شاخص‌های عمومی اگزوزومی تایید شد.

- *مهار تکثیر لنفوسیتی توسط اگزوزوم*

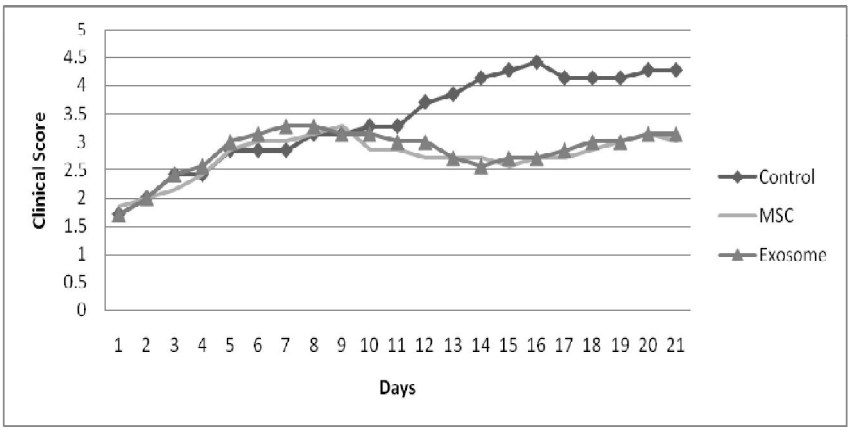
توانایی اگزوزوم‌ها در مهار تکثیر آنتی ژنیک لنفوسـیت‌هـا بـه صورت درصد مهار تکثیر در قیاس با گـروه کنتـرل، در نمـودار ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده از آزمون MTT، تأثیر معنی‌دار اگزوزوم‌ها را بر مهار تکثیـر لنفوسـیت‌هـای طحـالی در پاسـخ بـه تحریک آنتی ژنیک نشان می‌دهد ($p<0.001$). در قیـاس بـا مهـار القاء شده توسط دوز متناسب از سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمال، تأثیر مهاری اگزوزوم‌ها بر تکثیر لنفوسـیتی کـاهش معنـی‌داری را نشان می‌دهد($p<0.05$).



نمودار شماره (۱): تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال ((MSC و اگزوزوم‌های مشتق از آن ((Exosome را بر مهاری تکثیر آنتی ژنیک لنفوسیت‌های طحالی در قیاس با گروه کنترل (لنفوسیت‌های تحریک شده با آنتی ژن بدون حضور سلول‌های MSC یا Exosome) به صورت درصد مهار تکثیر سلولی نشان می‌دهد.

-تغییرات شدت علائم درمانگاهی

تأثیرات درمانی تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌های مشتق از آن بر تغییرات شدت علائم درمانگاهی و پیشرفت بیماری، در قیاس با گروه کنترل در هفته‌های اول، دوم و سوم پس از بروز علائم بالینی در نمودار۲ نشان داده شده است. کاهش محسوس شدت علائم درمانگاهی بیماری در موش‌های درمان شده با سلول و اگزوزوم، از هفته دوم دیده می‌شود. هرچند تأثیرات درمانی هر دو نوع درمان سلولی و غیر سلولی بر کاهش شدت علائم درمانگاهی بیماری در قیاس با گروه کنترل بدون درمان بسیار معنی‌دار بود ($p<0.01$) از لحاظ تأثیر بالینی درمان بر تخفیف شدت علائم درمانگاهی، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه درمان دیده نشد ($p>0.05$). بعلاوه در هیچ یک از گروه‌های درمان بهبودی کامل حاصل نگردید.

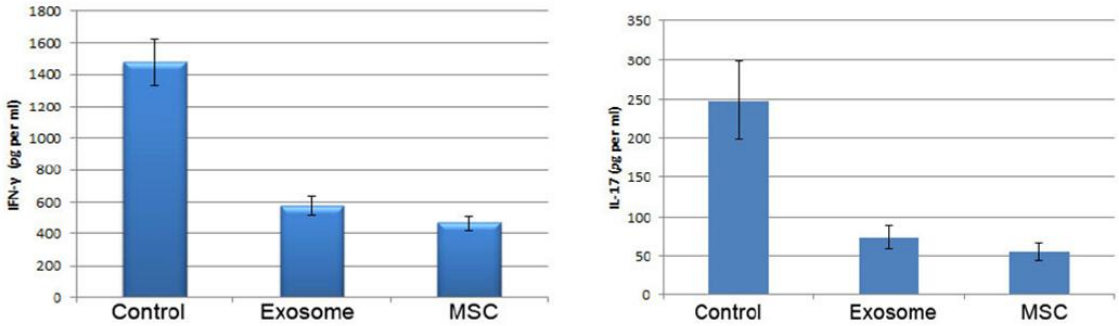


نمودار شماره (۲): تأثیر درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم‌های مشتق از آن (Exosome) را بر کاهش شدت علائم درمانگاهی بیماری در قیاس با گروه کنترل بدون درمان (Control) در طی ۲۱ روز پس از شروع درمان نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه درمان به لحاظ توانایی تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری مشاهده نگردید ($p>0.05$).

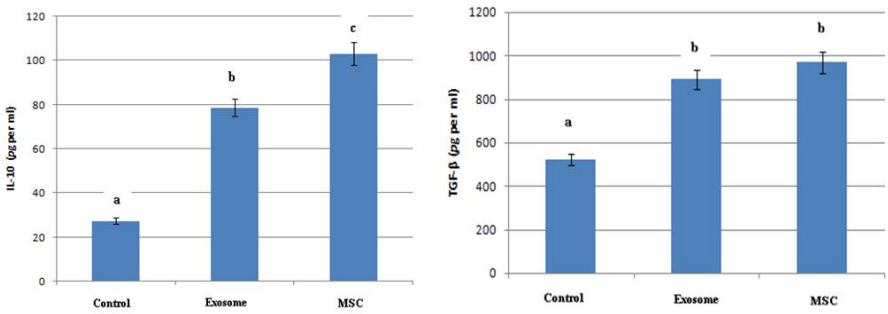
-تغییر پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی

نقش کلیدی سایتوکاین ها در شکل گیری، پیشرفت و تنظیم پاسخ‌های ایمنی در بیماری‌های خود ایمن موضوعی مشخص و ثابت شده است. از آنجایی که سایتوکاین های IFN-γ و IL-17 ترشح شده توسط لنفوسیت‌های TH1و TH17 به عنوان عمده‌ترین سایتوکاین های التهابی درگیر در روند پاتوژنز بیماری انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن شناخته می‌شوند (۱۴). به منظور ارزیابی توانایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر تعدیل یا تغییر جهت گیری پاسخ ایمنی زیرده های TH1و TH17، پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی برداشت شده از

موش‌های بیمار تحت درمان با اگزوزوم و سلول‌های بنیادی مزانشیمال در قیاس با گروه کنترل بدون درمان به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شواهد روز افزونی که نشان می‌دهد روند بهبودی در بیماران مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن و MS تا حد زیادی دربارهٔ مقادیر افزایش یافته IL-10 و TGF-β در سیستم اعصاب مرکزی وسرم این بیماران است (۱۴). تغییرات مقادیر ترشح شده این سایتوکاین ها در لنفوسیت‌های طحالی برداشت شده از موش‌های بیمار تحت درمان، در قیاس با گروه کنترل بدون درمان به روش الایزا بررسی گردید.



نمودار شماره (۳): مقادیر سایتوکاین های پیش التهابی IL-17 (راست) وIFN-γ (چپ) مترشحه از لنفوسیت‌های طحالی موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم‌های مشتق از آن (Exosome). سلول‌های طحالی برداشت شده از موش‌های بیمار درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌های مشتق از آن، در مجاورت سلول یا اگزوزوم، به وسیله پپتید آنتی ژنیک MOG_{35-55} برای مدت ۷۲ ساعت در شرایط in vitro تحریک شده و متعاقباً مایع رویی جهت اندازه گیری سایتوکاین های پیش التهابی رده TH1,TH17 جمع آوری گردید. مقادیر سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 (راست) و IFN-γ (چپ) با استفاده از کیت های تجاری الایزا تعیین گردید. در هر دو گروه درمان کاهش ترشح سایتوکاین های پیش التهابی دیده می‌شود. تغییرات مقادیر سایتوکاینی در بین همه گروه‌ها معنی‌دار است ($P<0.01$).



نمودار شماره (۴): مقادیر سایتوکاین های ضد التهابی IL-10 (چپ) و TGF-β1 (راست) مترشحه از لنفوسیت‌های طحالی موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم‌های مشتق از آن (Exosome). سلول‌های طحالی برداشت شده از موش‌های بیمار درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌های مشتق از آن، در مجاورت سلول یا اگزوزوم، بوسیله پپتید آنتی ژنیک MOG_{35-55} برای مدت ۷۲ ساعت در شرایط in vitro تحریک شده و متعاقباً مایع رویی جهت اندازه گیری سایتوکاین های ضد التهابی TGF-β1,IL-10 جمع آوری گردید. مقادیر سایتوکاین های پیش التهابی IL-10 (راست) و TGF-β1 (چپ) با استفاده از کیت های تجاری الایزا تعیین گردید. حروف نامتشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها است($p<0.05$) .

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد یک کاهش زیاد در مقادیر IFN-γ و IL-17 مترشحه از لنفوسیت‌های طحالی، در موش‌های تحت درمان با اگزوزوم‌ها در قیاس با گروه کنترل بدون درمان دیده می‌شود (نمودار۳) ($p<0.001$). همزمان با این تغییرات، افزایش ترشح TGF-β1, IL-10 توسط لنفوسیت‌های طحالی ($p<0.001$)، می‌تواند نشان دهنده شیفت پاسخ‌های ایمنی زیر

رده‌های TH1و TH17 به سمت زیر رده تنظیمی T reg باشد (نمودار۴). افزایش ترشح سایتوکاین های ضد التهابی IL-10 و کاهش ترشح سایتوکاین های پیش التهابی IL-17 و IFN-γ در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال چشمگیرتر از گروه درمان شده با اگزوزوم‌ها می‌باشد ($p\leq0.05$). اختلاف معنی‌داری در مقادیر TGF-β1 متعاقب درمان با اگزوزوم‌ها در قیاس با گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشاهده نگردید ($p>0.05$) (نمودار۴).

بحث

مهار تماسی سلول‌های ایمنی فعال شده توسط مجموعه لیگاند/ رسپتور مهاری، بخشی از ابزارهای تعدیل ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در سیستم‌های هم کشت با لنفوسیت‌ها است (۲۳-۲۱). نقش مولکول‌های مهاری بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال (PD-L1، Galectins، TGF-β، HLA-G) عمدتاً شامل ارسال سیگنالینگ مهاری در لنفوسیت‌های فعال شده بیان کننده رسپتورهای متناظر و القاء سلول‌های رده تنظیمی T reg می باشد که نقش مهمی در پایان دادن به پاسخ‌های التهابی پیش‌رونده سیستم ایمنی، حفظ هموستاز و تحمل به خود ایفاء می‌کنند. اگزوزوم‌ها به عنوان وزیکل های کوچک مشتق از غشاء سلول، حامل مجموعه لیگاند/ رسپتوری بیان شده در سطح و سیتوپلاسم همین سلول‌ها بر روی غشاء خود می‌باشند از این رو به نظر می‌رسد که پتانسیل‌های مهار تماسی مشابهی با سلول مادر داشته باشند. هر چند برخی شواهد نشان می‌دهند که سیگنالینگ مجموعه لیگاند/ رسپتور قرار گرفته بر روی غشاء میکرووزیکل ها به مراتب قوی‌تر از سیگنالینگ همین مجموعه بر روی غشاء سلول عمل می‌کند (۱۱).

نخستین بار Ratajczak و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که میکرووزیکل‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند با مکانیسمی وابسته به mRNA منجر به برنامه ریزی مجدد ژنتیکی در سلول‌های پیش ساز خونی شوند (۶). مطالعات بعدی نشان داد که میکرووزیکل های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال قادر به کاهش چشمگیر جراحات ایجاد شده در انفارکتوس قلبی، آسیب‌های کبدی و کلیوی می باشند که خود می‌تواند بازتابی از پروفایل‌های ضد التهابی، تعدیل ایمنی و بازسازی کنندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان سلول‌های منشأ این اگزوزوم‌ها باشد (۷-۴). پیش‌تر نقش میکرووزیکل های توموری حامل لیگاندهای مهاری و توکسیک در سرکوب سلول‌های ایمنی و پیشبرد تهاجم تومور مشخص شده است (۲۵، ۲۴) .در مطالعات دیگر تأثیر تحمل زایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های دندرتیک نابالغ بر پیشبرد بقاء پیوند و کاهش التهاب در یک مدل از شوک سپتیک نشان داده شده است (۲۶) .نتایج مشابهی توسط اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های دندرتیک تغییر ژنتیکی شده تحمل زا، در کاهش التهاب بیماری آرتریت روماتوئید بدست آمده است (۲۸، ۲۷).

به نظر می‌رسد که طبیعت و ماهیت اگزوزوم‌های القاء کننده پاسخ‌های ایمنی تا حد زیادی بستگی به حالت فیزیولوژیک سلول دهنده دارد. به طور اختصاصی اگزوزوم‌های القاء کننده تحمل ایمنی، حاوی مولکول‌هایی نظیر TGF-β، PD-L1، PD-L2 و Fas-L بر روی غشا خود می‌باشند که منعکس کننده بیان سطحی و سیتوپلاسمیک این مولکول‌ها در سلول مادر است (۸).

در مطالعه حاضر، توقف یا کند شدن روند رو به پیشرفت بیماری با بررسی روزانه علائم بیماری، در توافق با نتایج بدست آمده از تغییر پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی به سمت پروفایل ضد التهابی می‌باشد. کاهش مقادیر IFN-γ (شاخص TH1) و IL-17 (شاخص TH17) و افزایش مقادیر سایتوکاین ضد التهابی ,TGF-β IL-10 در لنفوسیت‌های طحالی برداشت شده از موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن نشان‌دهنده شیفت پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی از زیر رده TH1 به سمت زیر رده T تنظیمی می‌باشد. پولاریزاسیون یا جهت گیری سلول‌های T خود واکنشگر به سمت زیر رده‌های یاد شده می‌تواند در نتیجه مهار یا تعدیل عملکردی این سلول‌ها متعاقب تماس با اگزوزوم‌ها و دریافت پیام مهاری باشد. مضاف بر این، بر اساس توانایی انتقال غشایی اگزوزوم‌ها، متعاقب ارسال پیام مهاری، غشاء اگزوزومی با غشاء سلول ادغام شده و سلول خود واکنشگر به عنوان سلول عرضه کننده لیگاند یا رسپتور مهاری برای دیگر سلول‌ها عمل کند (۸). از آنجایی که دامنه هدف گیری اگزوزوم‌ها خصوصاً متعاقب تجویز سیستمیک در مدل‌های In vivo، محدود به رده مشخصی از سلول‌ها نمی‌باشد بنابراین دامنه عملکردی آن‌ها نیز بسیار گسترده می‌باشد. اهمیت این موضوع بیشتر از این لحاظ قابل بحث می‌باشد که سلول‌های ایمنی درگیر در پاتوژنز بیماری محدود به لنفوسیت‌های T نبوده و عملکردهای نابجای لنفوسیت‌های B تولید کننده آنتی بادی بر ضد آنتی ژن‌های خودی و ماکروفاژ های فعال شده در پیشرفت بیماری و ایجاد آسیب‌های بافتی امری محرز می‌باشد (۲۹). تعدیل پاسخ‌های ایمنی لنفوسیت‌های B و ماکروفاژ های فعال شده از طریق تعامل با لیگاندهای مهاری اگزوزوم‌ها و القاء تغییر فنوتیپی از طریق انتقال مجموعه لیگاند/ رسپتوری مهاری عملکردی بر روی غشاء سلول‌های هدف از جمله مکانیسم‌های تعدیل ایمنی محتمل بکار گرفته شده توسط اگزوزوم‌ها می‌باشد. به نظر می‌رسد که با توجه

به فراوانی کم سلول‌های بنیادی مزانشیمال در بدن، اگزوزوم‌های آزاد سازی شده توسط این سلول‌ها به عنوان ابزاری جهت اعمال عملکردهای پاراکرین در نقاط دور دست بدن بکار گرفته می‌شوند.

علی رغم تأثیرات چشمگیرتر سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر مهار تکثیر لنفوسیتی و تعدیل پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های T خود واکنشگر، تأثیر آن بر تخفیف شدت علائم درمانگاهی و پیشرفت بیماری در قیاس با درمان اگزوزومی انجام گرفته، تفاوت محسوسی را نشان نمی‌دهد. بخشی از چشمگیری تأثیرات سلول درمانی می‌تواند در نتیجه عدم تناسب دوز دریافتی بین سلول و اگزوزوم‌های مشتق از آن باشد که علت آن محدودیت در دوز و تعداد دفعات قابل تجویز به علت محدودیت آناتومیکی موضع تزریق در ورید دمی موش می‌باشد، محدودیتی که عملاً در مدل‌های in vivo به علت افزایش احتمال بروز واکنش‌های ازدیاد حساسیت و ریسک ناپایداری ژنتیکی، متوجه سلول درمانی و نه اگزوزوم درمانی می‌باشد. هر چند به لحاظ تئوریک استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به دلیل ویژگی تولید پایدار فاکتورهای سرکوب ایمنی (سایتوکاین،آنزیم و متابولیت ها) و فاکتورهای تغذیه‌ای، مزیتی چشمگیر نسبت به اگزوزوم درمانی دارد اما این مزیت بیشتر از این جهت اهمیت خود را از دست می‌دهد که بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعات متعدد، درصد قابل توجهی از سلول‌ها در یک هفته اول پس از تجویز in vivo در نتیجه استرس‌های محیطی در داخل بدن دچار مرگ سلولی می‌شوند. از این رو دوز استفاده شده در درمان اگزوزومی در هر صورت یک دوز کاملاً موثر، پایدار محسوب می‌شود. از سوی دیگر با توجه به اینکه در موارد درمان آلوژنیک با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر خلاف سلول‌های مادر، بیان زودگذر مولکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی MHC II رخ نمی‌دهد بنابراین در معرض رد ایمنی قرار نمی‌گیرند (۳۰، ۵).

با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال پتانسیل‌های سرکوب ایمنی موثر، جهت پیشبرد اهداف درمانی را داشته باشند. از سوی دیگر، ایده تولید انبوه "سلول بنیادی دهنده همگانی" با استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌تواند به عنوان یک هدف قابل حصول و زیست ایمن در درمان بیماری‌های خود ایمن مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بودجه پژوهشی مصوب دانشگاه ارومیه می‌باشد. نویسندگان مقاله از زحمات پرسنل محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه و آقایان یوسف ثانی و اصغر علیاری در آزمایشگاه ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and diseases. J Nat Rev 2008; 8: 726-36.
2. Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev 2009; 20: 419-27.
3. Porada CD, Almedia-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 1156-66.
4. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2010; 4: 214-22.
5. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F et al. Mesenchymal stem cell-Derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol 2009; 20: 1053-67.
6. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors :evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. Leukemia 2006; 20: 847-56.
7. Herrara MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sorid A, Cantarella D et al. Human liver stem cell -derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. J cell Mol Med 2010; 14:1605-18.
8. Thery C, Ostrowski M, Seyura E. Membrane Vesicles as Conveyors of Immun responses. Nat Rev Immunol 2009; 9: 581-93.
9. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosomes-mediated transfer of

mRNA and micro- RNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat cell Biol 2007; 9: 654-9.

10. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grang C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. Am J Cancer Res 2011; 1(1): 98-110.
11. Farsad K. Exosomes: novel organelles implicated in immunomodulation and apoptosis. Yale J Biol Med 2002; 75: 95-101.
12. Buyanovskaya OA, Kuleshov NP, Nikitina VA, Voronina ES, Katosova LD, Bochkov NP. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. Bull Exp Biol Med 2009; 148 (1): 109-12.
13. Zhou FY, Bosch-Marche M, Okuyama H, Krishnamachary B, Kimura H, Zhang L et al. Spontaneous Transformation of Cultured Mouse Bone Marrow-Derived Stromal Cells. Cancer Res 2006; 66: 10849-54.
14. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol 2010; 162: 1-11.
15. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. Blood 2005; 106 (5): 1755-61.
16. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In: Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM, Editor. Current Protocols in Cell Biology New York: John Wiley & Sons; 2006.
17. Gao K, Chen Y, Wei L, Li S, Jin X, Cong C et al. Inhibitory effect or of mesanchymal stem cell on Lymphocytes proliferation. Cell Biochem Func 2008; 26: 900-7.
18. Chaput N, Taieb J, Andre F, Zitvogel L. The potential of exosomes in immunotherapy. Exper Opin Biol Ther 2005; 5: 737-47.
19. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. Immunol Lett 2006; 107: 102-8.
20. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature 2003; 422: 688-94.
21. Augello A, Tasso R, Negrini S, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of Programmed Death 1 pathway. Eur J Immunol 2005; 35:1482-90.
22. Di Ianni M, Del Papa B, De Loanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. Exp Hematol 2008; 36:309-18.
23. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Raffaella ZM, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. Haematologica 2007; 92: 881-8.
24. Abusumra AG, Zheonj Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL et al. Tumor exosomes expressing Fas Ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. Blood Cells Mol Dis 2005; 35:169-73.
25. Zhang P, Su DM, Liang M, Fu J. Chemopreventive agents induce programmed death-1 ligand (PD-L1) Surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1 mediated T cell apoptosis. Mol Immunol 2007; 45: 1740-6.
26. Peche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi M. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone-marrow dendretic cell-

derived exosomes modulate allograft rejection. Transplantation 2003; 76: 1503-10.

27. Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, Morelli AE, Robbins PD. Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendretic cells genetically modified to express IL-4. J Immunol 2007; 179: 2242-9.
28. Bianco NR, Kim SH, Ruffner MA, Robbins PD. Therapeutic effect of exosomes from Indoleamine 2,3-Dioxygenase-positive dendretic cells in collagen-induced arthritis and delayed -type hypersensitivity disease models. Arthritis Rheum 2009; 60(2): 380-9.
29. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HB. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. Nat Clin Prac Neurol 2006; 2: 201-11.
30. Batten P, Rosenthal NA, Yacoub MH. Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. Phil Trans R Soc 2007; 362: 1343-56.