

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

آرام مکاری زاده^{۱*}، دکتر نوروز دلیرز^۲، احمد مرشدی^۳، دکتر امیرعباس فرشید^۴، قاسم مسیبی^۵

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 لنفوسیت‌های 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 (5×10^5 سلول) و اگزوزوم‌های مشتق از آن ($50 \mu\text{g}$) 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- β) به روش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون (MTT) **یافته‌ها:** داده‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم‌های مشتق از آن، از طریق کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی IFN- γ ، IL-17، افزایش ترشح سایتوکاین‌های ضد التهابی (IL-10، TGF- β) 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

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 (Glectins، HLA-G، TGF- β ، PD-L1)، تولید یک سری سایتوکاین‌های ضد التهابی (IL-10، TGF- β)، آنزیم‌های مهارکننده

سلول‌های بنیادی مزانشیمال^۱ به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز تعریف می‌شوند که جمعیت هتروژن بسیار کوچکی شامل ۰.۰۰۱-۰.۰۱ 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

^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

^۴ دانشیار بخش پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۵ دانشیار بخش میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

سانتریفیوژ (1500 rpm) برای مدت 5 دقیقه) در PBS²، سلول ها با غلظت 4×10^5 cell/cm² به فلاسک های کشت T75 حاوی محیط کشت DMEM-LG (Gibco- انگلستان) و 10 درصد FBS (Gibco- انگلستان) منتقل شدند. سلول ها در دمای 37 درجه و در حضور 5 درصد گاز CO2 برای مدت 12 ساعت انکوبه شده و متعاقب تعویض مایع رویی کشت، سلول های غیر چسبنده حذف گردیده و کشت سلول های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار انجام گرفته و پس از اولین Confluency >70% سلول های چسبنده با استفاده از تریپسین (Sigma-Aldrich- آمریکا) حاوی 2 درصد EDTA جداسازی گردیده و جهت پاساژ بعدی به فلاسک های T25 منتقل گردیدند. نهایتاً از پاساژ سوم سلول ها جهت درمان استفاده گردید (15).

بررسی شاخص های سطحی سلول های بنیادی مزانشیمال به روش فلوسایتومتری

سلول های MSC به دست آمده در پاساژ سوم کشت سلولی جهت تأیید بیان مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی به روش فلوسایتومتری (Partec GmbH, PAS flow cytometer, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند. از مونوکلونال آنتی بادی های ضد مارکرهای CD29-FITC و CD73-PE و Sca-1-FITC (eBioscience) به عنوان شاخص های مثبت سلول های بنیادی و از مونوکلونال آنتی بادی ضد CD45-FITC (eBioscience) به عنوان شاخص منفی این سلول ها استفاده گردید (3).
جداسازی اگزوزوم ها به روش سانتریفیوژ تفریقی⁴

اگزوزوم ها از مایع رویی کشت سلول های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت DMEM عاری از FBS که حاوی 5 درصد BSA⁵ بود در زمان Confluency بالای 70 درصد به روش سانتریفیوژ تفریقی مطابق روش Thery و همکاران (16) جداسازی گردید (زنده مانی (95%)، به طور خلاصه متعاقب سانتریفیوژ مایع رویی کشت سلول با دور 2000g جهت رفع بقایای سلولی و 10000g جهت رفع بارتیکل ها، مایع رویی فاقد سلول با دور 10000g برای مدت 2 ساعت در دمای 4 درجه سانتریفیوژ شده و پلت به دست آمده پس از شستشو با PBS تحت سانتریفیوژ مجدد با دور 10000g برای مدت 2 ساعت قرار گرفت. پلت نهایی بدست آمده از اگزوزوم ها در PBS تعلیق سازی شده و غلظت پروتئینی آن به روش برادفورد تعیین گردید (16).

تأیید جداسازی اگزوزوم ها

(ماتریکس متالوپروتئینازها) و متابولیت ها (PGE2, IDO, NO) است که به صورت پاراکرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول عملکرد مهاری خود را بر جای می گذارند (3,2). شواهد حاصل از مطالعات اخیر نشان می دهد که بسیاری از اثرات پاراکرین سلول های بنیادی مزانشیمال به واسطه آزاد سازی وزیکل های کوچک به قطر 150-50 نانومتر صورت می پذیرد که اگزوزوم¹ نامیده می شوند (3-7).

اگزوزوم ها وزیکل های کوچکی هستند که از غشاء سلول منشأ می گیرند و در ریز محیط اطراف سلول آزاد می شوند. این وزیکل ها حامل یک مجموعه انتخابی از مجموعه لیگاندها/ رستپور، محتویات آنزیمی، سایتوکاینی و مواد ژنتیکی سلول مادر می باشند که متعاقب اتصال و اینترنالیزه شدن به داخل سلول هدف، منجر به ارسال پیام های تحریکی یا مهاری، برنامه ریزی مجدد ژنتیکی و تغییر فنوتیپی در سلول های هدف می شوند (8-10). استفاده درمانی از اگزوزوم ها به عنوان یک روش درمان غیر سلولی یکسری مزایایی دارد که می تواند توجیه مناسبی برای جایگزینی آن در روش های معمول سلول درمانی باشد. به طور خلاصه اگزوزوم ها در قیاس با سلول به لحاظ ساختاری و عملکردی با ثبات تر بوده و قابلیت ذخیره سازی نامحدودتری دارند (4). بعلاوه پیام دهی تحریکی یا مهاری ناشی از اگزوزوم ها در قیاس با سلول به مراتب قوی تر بوده (11) و مخاطرات ناشی از بروز ناپایداری ژنتیکی (13)، (4، 12) و رد ایمنی متعاقب تجویز آلوژنیک (5) را در مدل های in vivo ندارند.

انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن به عنوان یک بیماری دمیله کننده سیستم اعصاب مرکزی توصیف می شود که در نتیجه عبور سلول های TCD4 خود واکنشگر از سد خونی- مغزی و پاسخ نابجای آن به آنتی ژن های میلینی سیستم اعصاب مرکزی ایجاد می شود (14، 15). در مطالعه حاضر، امکان مهار یا تعدیل پاسخ های آسیب زای سلول های TCD4 خود واکنشگر (زیر رده های TH17, TH1) با استفاده از اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمال به عنوان یک روش جایگزین سلول درمانی مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

جداسازی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمال

سلول های مغز استخوان های Tibia و Femur موش های 6-8 هفته C57Bl/6 ماده، مطابق روش Zappia و همکاران (15) به روش فلاشینگ جداسازی شده و متعاقب دوبار شستشو با

² Phosphate buffered saline

³ Fetal bovine serum

⁴ Differential centrifugation

⁵ Bovine serum albumin

¹ Exosome

الایزا ریدر ثبت گردید. درصد مهار تکثیر لنفوسیتی با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$\text{Inhibition ratio of cell proliferation: } [\text{OD}_{520}(\text{Lymphocyte}+\text{MOG}+\text{MSC or Exosome}) - \text{OD}_{520}(\text{Lymphocyte}+\text{MOG})] / [\text{OD}_{520}(\text{Lymphocyte}+\text{MOG}) - \text{OD}_{520}(\text{MSC or Exosome}+\text{MOG})] \times 100\%$$

القاء بیماری و پروتوکل درمان

موش‌های C57BL/6 ماده ۶ تا ۸ هفته، از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط استاندارد محیطی و غذایی نگهداری شدند. تمامی مراحل تحقیق مطابق اصول بهداشتی و اخلاقی پذیرفته شده در کمیته‌های اخلاقی حفظ و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی صورت پذیرفت. القاء بیماری انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن مطابق روش Pluchino و همکارانش (۲۰) با اندکی تغییر انجام پذیرفت. به طور خلاصه، موش‌ها تحت تزریق زیر جلدی با $200 \mu\text{g}$ (پپتید AnaSpec) MOG_{35-55} امولسیفیه شده در $100 \mu\text{l}$ ادجوانت فروند کامل (Sigma-Aldrich - آمریکا) در ناحیه پشت قرار گرفتند. متعاقباً تزریق داخل صفاقی 400 ng سم سیاه سرفه (Sigma-Aldrich - آمریکا) رقیق شده در $400 \mu\text{l}$ فسفات بافر سالین، در روز اول تزریق و ۴۸ ساعت بعد انجام پذیرفت. بلافاصله پس از ظهور علائم بیماری، موش‌ها از لحاظ شدت بیماری و شرایط فیزیکی امتیاز دهی شده و جهت ایجاد شرایط مساوی با احتساب این امتیاز دهی در ۳ گروه (۷ سر موش/گروه) تقسیم بندی شدند. در گروه کنترل موش‌ها در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از بروز نخستین علائم بیماری تحت سه تزریق داخل وریدی در ورید دمی با $200 \mu\text{l}$ میکرولیتر بافر فسفات سالین قرار گرفتند. در گروه درمان (A) موش‌ها تحت سه تزریق در ورید دمی با $10^5 \times 5$ سلول در حجم $200 \mu\text{l}$ میکرولیتر قرار گرفتند. در گروه (B) موش‌ها تحت سه تزریق در ورید دمی با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به میزان $50 \mu\text{g}$ در حجم $200 \mu\text{l}$ میکرولیتر قرار گرفتند.

ارزیابی علائم بالینی بیماری به صورت روزانه

به منظور ارزیابی تأثیرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال و اگزوزم‌های مشتق از آن بر تغییرات شدت علائم بالینی بیماری، تزریق داخل وریدی سلول‌ها (5×10^5) سلول و اگزوزوم‌ها ($50 \mu\text{g}$) در سه نوبت در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از بروز علائم بیماری انجام پذیرفت. شدت علائم بالینی بیماری به صورت روزانه بررسی گردیده و بر اساس سیستم امتیاز دهی ذیل امتیاز دهی گردید. (0 عدم بیماری، ۱ شلی دم، ۲ فلجی دم، ۳ فلجی یک پا، ۴ فلجی کامل دو پا، ۵ فلجی دو پا و یک دست، ۶ فلجی چهار دست و پا، ۷ مرگ)

پوشش دادن اگزوزوم‌ها بر روی بید لاتکس به روش Thery و همکاران (۱۶) انجام پذیرفت. به طور خلاصه اگزوزوم‌ها به همراه لاتکس بیدهای آلدئید/سولفات ۴ میکرومتری (Invitrogen - انگلستان) برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند. متعاقباً جهت اتمام واکنش باندینگ، 100 mM گلیسین (Merck - آلمان) اضافه گردید. بیدهای پوشش داده شده با اگزوزوم پس از سه بار شستشو در PBS با استفاده از سانتریفیوژ برای مدت ۱۰ دقیقه در دور 3000 g مجدداً در بافر فسفات سالین تعلیق سازی گردیدند. اگزوزوم‌های پوشش داده شده بر روی بیدهای لاتکس، جهت تأیید بیان مارکرهای اختصاصی اگزوزوم با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی‌های اختصاصی آنتی CD9-FITC و CD81-FITC (eBioscience) (۱۹،۱۸) رنگ آمیزی شده و در دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردیدند.

میکروسکوپ الکترونی

اگزوزوم‌های جداسازی شده به روش سانتریفیوژ تفریقی، در بافر فسفات سالین تعلیق سازی شده و سپس $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر از آن بر روی گرید کت شده با کربن منتقل گردید. رنگ آمیزی نگاتیو با استفاده از $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر محلول آبی فسفو تنگستنیک اسید ۱ درصد خنثی انجام پذیرفت. بررسی‌های مربوط به مرفولوژی و اندازه وزیکل‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (Philips BioTwin, CM100, The Netherlands) در ولتاژ 80Kv انجام گرفته و عکس‌های میکروگراف تهیه گردید.

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

آزمون مهار تکثیر لنفوسیتی، مطابق روش Gao و همکاران (۱۷) انجام پذیرفت. به طور خلاصه لنفوسیت‌های طحالی برداشت شده از موش‌های بیمار پس از شمارش و تعلیق سازی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۵% FBS (10^5 سلول در حجم $100 \mu\text{l}$ میکرولیتر) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شده و تحت تیمار با $50 \mu\text{l}$ محیط کشت حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمال (10^4 سلول) و یا اگزوزوم‌های مشتق از آن ($10 \mu\text{g}$) قرار گرفتند. جهت تحریک تکثیر آنتی ژنیک از پپتید ($5 \mu\text{g/ml}$) MOG_{35-55} استفاده گردید. متعاقب ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C و غلظت پنج درصد گاز CO_2 ، $20 \mu\text{l}$ محلول MTT ($5 \text{ میلی گرم در } 1 \text{ میلی لیتر بافر فسفات سالین}$) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و مجدداً برای مدت ۴ ساعت انکوباسیون گردید. در پایان زمان انکوباسیون، با افزودن $100 \mu\text{l}$ دی متیل سولفوکساید (Sigma-Aldrich - آمریکا) به هر چاهک و انکوباسیون آن برای مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور Shaker دار، شدت نور جذب شده در طول موج 520 nm با استفاده از دستگاه

سنجش سایتوکاین

سه هفته پس از بروز علائم بیماری، موش ها به شیوه انسانی با استفاده از تیوپنتال سدیم کشتار گردیده و سلول های طحالی آن ها جهت بررسی پروفایل سایتوکاینی جداسازی و کشت گردید. مایع رویی کشت سه روزه سلول های طحالی مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال یا آگروزوم های مشتق از آن، در حضور پپتید آنتی ژنیک MOG₃₅₋₅₅ جهت اندازه گیری مقادیر سایتوکاین های مترشح IL-10، IL-17، IFN- γ ، TGF- β 1 جمع آوری و با استفاده از کیت های تجاری الایزا (eBioscience) اندازه گیری گردید.

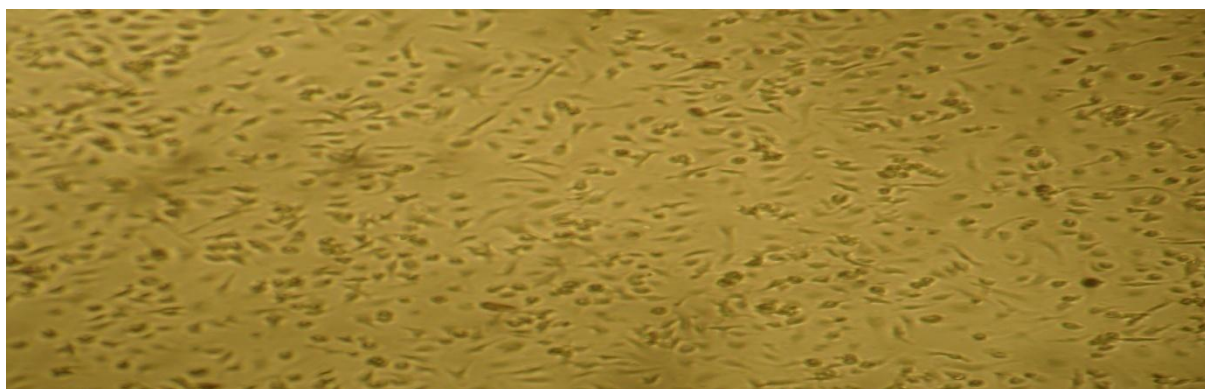
بررسی های آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده های آماری مربوط به تغییرات غلظت سایتوکاین ها از روش تحلیل واریانس یک طرفه (one way ANOVA) نرم افزار MINITAB استفاده گردید. به منظور ارزیابی و مقایسه تغییرات شدت علائم درمانگاهی در گروه های مختلف

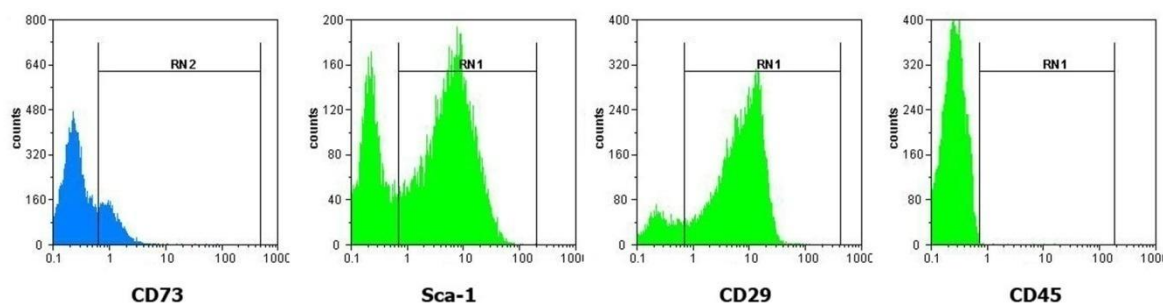
درمانی، متعاقب تبدیل داده های غیر پارامتریک به داده های پارامتریک از روش General Linear Model و اندازه های تکراری (Repeated Measure) نرم افزار SPSS ویراست ۱۸ استفاده گردید. در تمامی بررسی ها سطح معنی دار آزمون $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

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



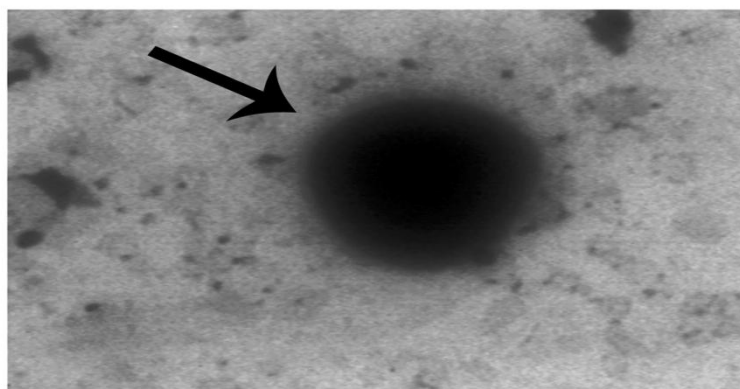
شکل شماره (۱): سلول های بنیادی مزانشیمال کشت شده در پاساژ سوم به شکل سلول های دوکی و شبیه فیروبلست در تصویر دیده می شوند.



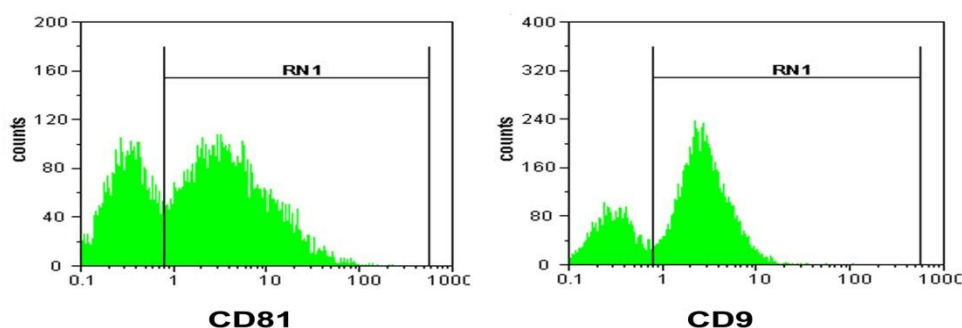
شکل شماره (۲): سلول های بدست آمده از پاساژ سوم کشت سلول های مغز استخوان موش های C57BL/6، جهت تایید بیان مارکرهای سلول بنیادی مزانشیمال با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی های اختصاصی رنگ آمیزی شده و به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. بیان سطحی مارکر های CD73 و Sca-1، CD29 به عنوان شاخص سلول های بنیادی مزانشیمال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

-بررسی اگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و فلوسایتومتری
وزیکل‌های کوچک با مرفولوژی بیضی شکل در میکروگراف‌های بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی رویت گردید (شکل ۳).
دامنه اندازه وزیکل‌ها بر اساس کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین وزیکل

دیده شده در میکروگراف‌های متعدد بین ۲۰۰-۵۰ نانومتر تعیین گردید. با این حال اکثریت عمده وزیکل‌ها اندازه‌ای کوچک‌تر از ۱۵۰ نانومتر داشتند بررسی شاخص‌های سطحی به روش فلوسیتومتری، بیان سطحی مارکرهای CD81, CD9 (شاخص 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

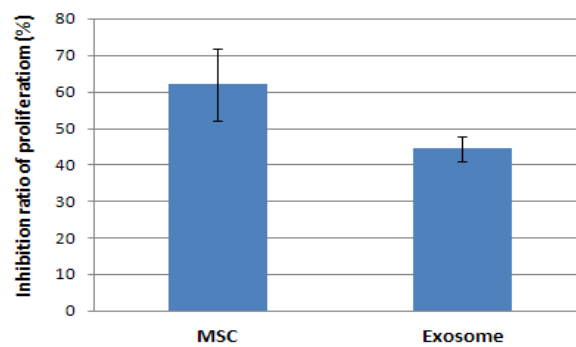


شکل شماره (۴): اگزوزوم‌های جداسازی از مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال، جهت بررسی حضور شاخص‌های عمومی اگزوزومی بر روی بیدهای لاتکس منتقل شده و به روش فلوسایتومتری بررسی گردیدند. بیان مارکرهای CD9, CD81 بر روی غشاء اگزوزومی به عنوان شاخص‌های عمومی اگزوزومی تایید شد.

- مهار تکثیر لنفوسیتی توسط اگزوزوم

توانایی اگزوزوم‌ها در مهار تکثیر آنتی ژنیک لنفوسیت‌ها به صورت درصد مهار تکثیر در قیاس با گروه کنترل، در نمودار ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده از آزمون MTT، تأثیر معنی‌دار اگزوزوم‌ها را بر مهار تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در پاسخ به

تحریک آنتی ژنیک نشان می‌دهد ($p < 0.001$)، در قیاس با مهار القاء شده توسط دوز متناسب از سلول‌های بنیادی مزانشیمال، تأثیر مهار اگزوزوم‌ها بر تکثیر لنفوسیتی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

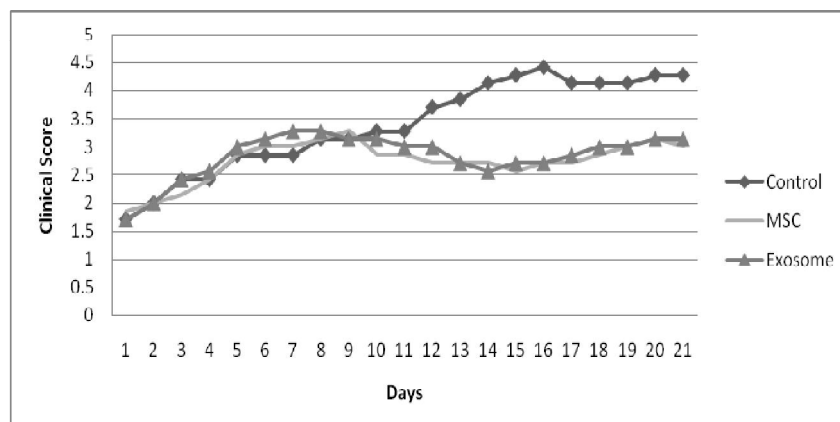


نمودار شماره (۱): تأثیر سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم های مشتق از آن (Exosome) را بر مهارت تکثیر آنتی ژنیک لنفوسیت های طحالی در قیاس با گروه کنترل (لنفوسیت های تحریک شده با آنتی ژن بدون حضور سلول های MSC یا Exosome) به صورت درصد مهار تکثیر سلولی نشان می دهد.

-تغییرات شدت علائم درمانگاهی

تأثیرات درمانی تجویز سلول های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم های مشتق از آن بر تغییرات شدت علائم درمانگاهی و پیشرفت بیماری، در قیاس با گروه کنترل در هفته های اول، دوم و سوم پس از بروز علائم بالینی در نمودار ۲ نشان داده شده است. کاهش محسوس شدت علائم درمانگاهی بیماری در موش های درمان شده با سلول و اگزوزوم، از هفته دوم دیده می شود، 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 معنی دار بود ($p < 0.01$) از لحاظ تأثیر بالینی درمان بر تخفیف شدت علائم درمانگاهی، تفاوت معنی داری بین دو گروه درمان دیده نشد ($p > 0.05$). بعلاوه در هیچ یک از گروه های درمان بهبودی کامل حاصل نگردید.



نمودار شماره (۲): تأثیر درمانی سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم های 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 می دهد. تفاوت معنی داری بین دو گروه درمان به لحاظ توانایی تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

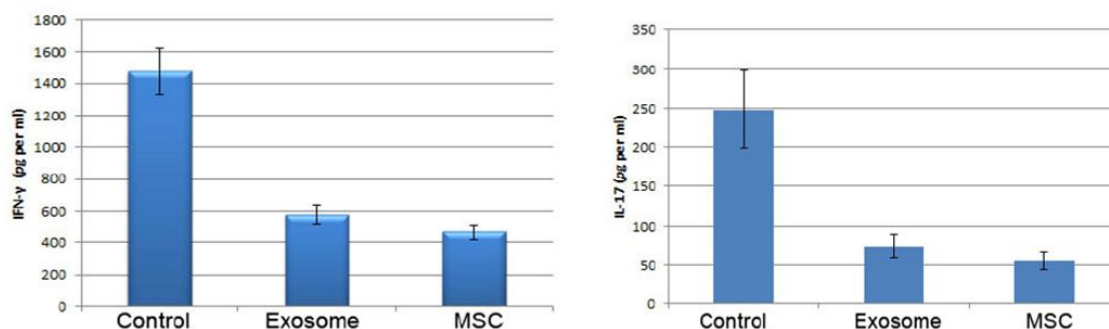
-تغییر پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت های طحالی

نقش کلیدی سایتوکاین ها در شکل گیری، پیشرفت و تنظیم پاسخ های ایمنی در بیماری های خود ایمن موضوعی مشخص و ثابت شده است. از آنجایی که سایتوکاین های $IFN-\gamma$ و $IL-17$ ترشح شده توسط لنفوسیت های $TH1$ و $TH17$ به عنوان

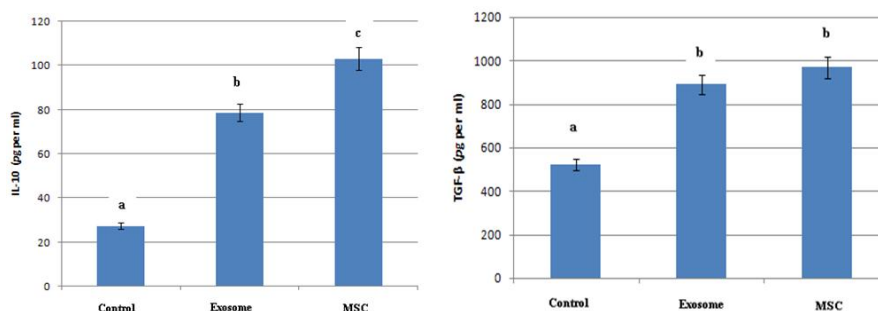
عمده ترین سایتوکاین های التهابی درگیر در روند پاتوژنز بیماری انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن شناخته می شوند (۱۴). به منظور ارزیابی توانایی اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمال بر تعدیل یا تغییر جهت گیری پاسخ ایمنی زیررده های $TH1$ و $TH17$ ، پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت های طحالی برداشت شده از

TGF- β در سیستم اعصاب مرکزی و سرم این بیماران است (۱۴). تغییرات مقادیر ترشح شده این سایتوکاین ها در لنفوسیت های طحالی برداشت شده از موش های بیمار تحت درمان، در قیاس با گروه کنترل بدون درمان به روش الایزا بررسی گردید.

موش های بیمار تحت درمان با اگزوزوم و سلول های بنیادی مزانشیمال در قیاس با گروه کنترل بدون درمان به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شواهد روز افزونی که نشان می دهد روند بهبودی در بیماران مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن و MS تا حد زیادی درباره مقادیر افزایش یافته IL-10 و



نمودار شماره (۳): مقادیر سایتوکاین های پیش التهابی IL-17 (راست) و IFN- γ (چپ) مترشح از لنفوسیت های طحالی موش های مبتلا به EAE درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم های مشتق از آن (Exosome)، سلول های طحالی برداشت شده از موش های بیمار درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم های مشتق از آن، در مجاورت سلول یا اگزوزوم، به وسیله پپتید آنتی ژنیک MOG₃₅₋₅₅ 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 سایتوکاین های 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 می شود. تغییرات مقادیر سایتوکاینی در بین همه گروه ها معنی دار است ($P < 0.01$).



نمودار شماره (۴): مقادیر سایتوکاین های ضد التهابی IL-10 (چپ) و TGF- β 1 (راست) مترشح از لنفوسیت های طحالی موش های مبتلا به EAE درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) و اگزوزوم های مشتق از آن (Exosome)، سلول های طحالی برداشت شده از موش های بیمار درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال و اگزوزوم های مشتق از آن، در مجاورت سلول یا اگزوزوم، بوسیله پپتید آنتی ژنیک MOG₃₅₋₅₅ برای مدت ۷۲ ساعت در شرایط *in vitro* تحریک شده و متعاقباً مایع رویی جهت اندازه گیری سایتوکاین های ضد التهابی TGF- β 1, IL-10 جمع آوری گردید. مقادیر سایتوکاین های پیش التهابی IL-10 (راست) و TGF- β 1 (چپ) با استفاده از کیت های تجاری الایزا تعیین گردید. حروف نامتشابه بر روی ستون ها نشان دهنده تفاوت معنی دار در بین گروه ها است ($p < 0.05$).

دیده می شود (نمودار ۳) ($p < 0.001$). همزمان با این تغییرات، افزایش ترشح TGF- β 1, IL-10 توسط لنفوسیت های طحالی می تواند نشان دهنده شیفت پاسخ های ایمنی زیر

همان گونه که نتایج نشان می دهد یک کاهش زیاد در مقادیر IFN- γ و IL-17 مترشح از لنفوسیت های طحالی، در موش های تحت درمان با اگزوزوم ها در قیاس با گروه کنترل بدون درمان

دندرتیک نابالغ بر پیشبرد بقاء پیوند و کاهش التهاب در یک مدل از شوک سپتیک نشان داده شده است (۲۶). نتایج مشابهی توسط اگزوزوم های مشتق از سلول های دندرتیک تغییر ژنتیکی شده تحمل زا، در کاهش التهاب بیماری آرتریت روماتوئید بدست آمده است (۲۸، ۲۷).

به نظر می رسد که طبیعت و ماهیت اگزوزوم های القاء کننده پاسخ های ایمنی تا حد زیادی بستگی به حالت فیزیولوژیک سلول دهنده دارد. به طور اختصاصی اگزوزوم های القاء کننده تحمل ایمنی، حاوی مولکول هایی نظیر $TGF-\beta$ ، PD-L1، PD-L2 و Fas-L بر روی غشا خود می باشند که منعکس کننده بیان سطحی و سیتوپلاسمیک این مولکول ها 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 سایتوکائینی لنفوسیت های طحالی به سمت پروفایل ضد التهابی می باشد. کاهش مقادیر $IFN-\gamma$ (شاخص $TH1$) و $IL-17$ (شاخص $TH17$) و افزایش مقادیر سایتوکائین ضد التهابی $TGF-\beta$ ، $IL-10$ در لنفوسیت های طحالی برداشت شده از موش های مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک خودایمن نشان دهنده شیفت پروفایل سایتوکائینی لنفوسیت های طحالی از زیر رده $TH1$ به سمت زیر رده T تنظیمی می باشد. پولاریزاسیون یا جهت گیری سلول های T خود واکنشگر به سمت زیر رده های یاد شده می تواند در نتیجه مهار یا تعدیل عملکردی این سلول ها متعاقب تماس با اگزوزوم ها و دریافت پیام مهاری باشد. مضاف بر این، بر اساس توانایی انتقال غشایی اگزوزوم ها، متعاقب ارسال پیام مهاری، غشاء اگزوزومی با غشاء سلول ادغام شده و سلول خود واکنشگر به عنوان سلول عرضه کننده لیگاند یا ریسپتور مهاری برای دیگر سلول ها عمل کند (۸). از آنجایی که دامنه هدف گیری اگزوزوم ها خصوصاً متعاقب تجویز سیستمیک در مدل های *in vivo*، محدود به رده مشخصی از سلول ها نمی باشد بنابراین دامنه عملکردی آن ها نیز بسیار گسترده می باشد. اهمیت این موضوع بیشتر از این لحاظ قابل بحث می باشد که سلول های ایمنی درگیر در پاتوژنز بیماری محدود به لنفوسیت های T نبوده و عملکردهای نابجای لنفوسیت های B تولید کننده آنتی بادی بر ضد آنتی ژن های خودی و ماکروفاژ های فعال شده در پیشرفت بیماری و ایجاد آسیب های بافتی امری محرز می باشد (۲۹). تعدیل پاسخ های ایمنی لنفوسیت های B و ماکروفاژ های فعال شده از طریق تعامل با لیگاند های مهاری اگزوزوم ها و القاء تغییر فنوتیپی از طریق انتقال مجموعه لیگاند/ ریسپتور مهاری عملکردی بر روی غشاء سلول های هدف از جمله مکانیسم های تعدیل ایمنی محتمل بکار گرفته شده توسط اگزوزوم ها می باشد. به نظر می رسد که با توجه

رده های $TH1$ و $TH17$ به سمت زیر رده تنظیمی T reg باشد (نمودار ۴). افزایش ترشح سایتوکائین های ضد التهابی $IL-10$ و کاهش ترشح سایتوکائین های پیش التهابی $IL-17$ و $IFN-\gamma$ در گروه درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال چشمگیرتر از گروه درمان شده با اگزوزوم ها می باشد ($p \leq 0.05$). اختلاف معنی داری در مقادیر $TGF-\beta 1$ متعاقب درمان با اگزوزوم ها در قیاس با گروه درمان شده با سلول های بنیادی مزانشیمال مشاهده نگردید ($p > 0.05$) (نمودار ۴).

بحث

مهار تماسی سلول های ایمنی فعال شده توسط مجموعه لیگاند/ ریسپتور مهاری، بخشی از ابزارهای تعدیل ایمنی سلول های بنیادی مزانشیمال در سیستم های هم کشت با لنفوسیت ها است (۲۱-۲۳). نقش مولکول های مهاری بیان شده در سطح سلول های بنیادی مزانشیمال ($HLA-G$ ، $TGF-\beta$ ، Galectins، PD-L1) عمدتاً شامل ارسال سیگنالینگ مهاری در لنفوسیت های فعال شده بیان کننده ریسپتورهای متناظر و القاء سلول های رده تنظیمی T reg می باشد که نقش مهمی در پایان دادن به پاسخ های التهابی پیش رونده سیستم ایمنی، حفظ هموستاز و تحمل به خود ایفاء می کنند. اگزوزوم ها به عنوان وزیکل های کوچک مشتق از غشاء سلول، حامل مجموعه لیگاند/ ریسپتوری بیان شده در سطح و سیتوپلاسم همین سلول ها بر روی غشاء خود می باشند از این رو به نظر می رسد که پتانسیل های مهار تماسی مشابهی با سلول مادر داشته باشند. هر چند برخی شواهد نشان می دهند که سیگنالینگ مجموعه لیگاند/ ریسپتور قرار گرفته بر روی غشاء میکروویکل ها به مراتب قوی تر از سیگنالینگ همین مجموعه بر روی غشاء سلول عمل می کند (۱۱).

نخستین بار Ratajczak و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که میکروویکل های مشتق از سلول های بنیادی جنینی می توانند با مکانیسمی وابسته به mRNA منجر به برنامه ریزی مجدد ژنتیکی در سلول های پیش ساز خونی شوند (۶). مطالعات بعدی نشان داد که میکروویکل های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمال قادر به کاهش چشمگیر جراحات ایجاد شده در انفارکتوس قلبی، آسیب های کبدی و کلیوی می باشند که خود می تواند بازتابی از پروفایل های ضد التهابی، تعدیل ایمنی و بازسازی کنندگی سلول های بنیادی مزانشیمال به عنوان سلول های منشأ این اگزوزوم ها باشد (۴-۷). پیش تر نقش میکروویکل های توموری حامل لیگاند های مهاری و توکسیک در سرکوب سلول های ایمنی و پیشبرد تهاجم تومور مشخص شده است (۲۴، ۲۵). در مطالعات دیگر تأثیر تحمل زایی اگزوزوم های مشتق از سلول های

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 آلونژیک 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

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. علی‌رغم 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 متابولیت‌ها) 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

- 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. Herrera 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 of mesenchymal 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 dendritic 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 dendritic 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 dendritic 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.