مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۱۰، شماره ۴، صفحات ۲۲ الی ۴۰ (۱۴۰۲)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
Nova Biologica Reperta 10(4): 22-40 (2024)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI:10.61186/nbr.10.4.27

بررسی مقایسه‌ای چند روش آزمایشگاهی برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر گاو

حانیه قندچی[۱]، ریحانه رمضانی[۲]، سیده زهرا موسوی نژاد[۱]

[۱] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران [۲] گروه خانواده درمانی، پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: ریحانه رمضانی، re.ramezani@alzahra.ac.ir

چکیده. امروزه اگزوزوم‌های شیر به جهت دردسترس بودن و کارایی بسیار در محصولات آرایشی- بهداشتی و همچنین به عنوان نانوحامل‌های دارویی، بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. از آنجایی که یافتن روشی ساده و کارآمد برای جداسازی این وزیکول‌ها بسیار بااهمیت است، در این پژوهش به برخی روش‌های جداسازی اگزوزوم از شیر گاو مانند اولتراسانتریفیوژ، جداسازی با استفاده از پلیمر PEG و چند کیت تجاری داخلی پرداخته و مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها با استفاده از DLS و میکروسکوپ الکترونی انجام شده است. در روش اولتراسانتریفیوژ، به عنوان رایج‌ترین روش جداسازی اگزوزوم، تعداد ذرات مشاهده‌شده در تصاویر میکروسکوپ الکترونی بسیار پایین (۵±۲ پارتیکل در هر تصویر با بزرگنمایی تقریبی x ۶۰۰۰۰) برآورد شد، درحالی که در تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان، تعداد ذرات زیادی (۱۵۰±۳۰پارتیکل در هر تصویر با بزرگنمایی تقریبی x ۳۰۰۰۰۰) قابل مشاهده بود. در جداسازی با استفاده از PEG، میانگین قطر ذرات با تکنیک DLS، ۲۶۳ نانومتر و بیشتر از روش‌های اولتراسانتریفیوژ، کیت اگزوسیب و کیت آنااگزو که قطر ذرات به ترتیب ۱۷۶، ۱۴۲ و ۱۲۳ نانومتر بود، مشاهده گردید. میانگین قطر ذرات در تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان، ۱۰±۷۰-۳۰ نانومتر بود که نتایج DLS هم کوچک‌بودن سایز ذرات جداسازی‌شده را تأیید کرد. با توجه به تعداد زیاد ذرات ریز (۳۰ nm ≥) در نتایج میکروسکوپی کیت اگزوسان، این احتمال می‌رود که چنین ذراتی به وفور در شیر وجود دارند و ممکن است روش‌های دیگر قادر به جداسازی این ذرات ریز نبوده‌اند. در نهایت هر چند تمامی روش‌های مطالعه شده، قابلیت جداسازی اگزوزوم از شیر را داشتند ولی برای مقایسه دقیق‌تر و معرفی یک روش استاندارد برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو، لازم است مطالعات گسترده‌تری صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی. اگزوزوم، اولتراسانتریفیوژ، رسوب‌دهی با پلیمر، شیر، وزیکول‌های خارج‌سلولی

Comparative study of several laboratory methods for isolating exosomes from bovine milk

Hanieh Ghandchi[1], Reihaneh Ramezani[2], Zahra Moosavinejad[1]

[1] Biotechnology department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[2] Department of Family Therapy , Women Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran
Corresponding author: Reihaneh Ramezani, re.ramezani@alzahra.ac.ir

Abstract. Recently, milk exosomes have attracted much attention from researchers due to their availability and efficiency in cosmetic products and also as drug delivery nanocarriers. Since it is very important to find a simple and efficient method to purify these vesicles, in this research some methods of exosome isolation from bovine milk such as ultracentrifugation, using PEG polymer and several commercial kits were discussed and characterized. Detection of exosomes has been done using DLS and electron microscopy.
In ultracentrifugation, as the most common method of exosome isolation, the number of particles in the electron microscope images was estimated to be very low (5 ± 2 particles), while in the microscopic images of the Exosun kit, a large number of exosomes (150 ± 30 particles) was visible. In PEG precipitation, the average diameter of the particles in DLS results was 263 nm and more than the ultracentrifugation, Exocib and Anaexo kit, where the diameter of the particles was 176 nm, 142 nm, and 123 nm, respectively. The average diameter of the particles in the microscopic images of the Exosun kit was 30-70±10 nm, and DLS results confirmed the small size of the isolated particles. Considering the large number of small particles (≤ 30nm) in the microscopic results of the exosun kit, other methods may not have been able to isolate these small particles. Finally, although all the studied methods were able to isolate exosome from milk, more extensive studies are necessary to make a more accurate comparison and to introduce a standard method for isolating exosome from bovine's milk.

Key words. exosome, extracellular vesicles, milk, polymer precipitation, ultracentrifugation

Received 16.06.2023/ Revised 02.09.2023/ Accepted 09.09.2023/ Published 20.12.2024
دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۶/ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱/ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸/ انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

مقدمه

وزیکول‌های خارج سلولی شامل اگزوزوم‌ها، میکرووزیکول‌ها و آپوپتوتیک بادی‌ها، توسط انواع سلول‌ها به فضای خارج سلولی آزاد می‌شوند. این وزیکول‌ها دارای غشاء دولایه لیپیدی هستند و در بیوژنز، مسیر آزادسازی، اندازه، محتویات و عملکرد با همدیگر تفاوت دارند. محتویات این وزیکول‌ها شامل لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های مرتبط با غشای پلاسمایی، سیتوزول و متابولیسم لیپید می‌شود (L. M. Doyle & M. Z. Wang, 2019). اگزوزوم‌ها کوچکترین دسته از این وزیکول‌ها، اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۵۰ نانومتر دارند (Zhou et al., 2020). در برخی منابع اندازه اگزوزوم را ۳۰ الی ۳۰۰ نانومتر در نظر گرفته‌اند (Jung & Mun, 2018). گروه بعدی، میکرووزیکول‌ها ۵۰ نانومتر الی ۱ میکرومتر هستند که بزرگتر از اگزوزوم ها بوده و به طور مستقیم از جوانه زدن غشای سیتوپلاسمی ناشی می‌شوند. دسته بعدی وزیکول‌های خارج سلولی، آپوپتوتیک بادی‌ها هستند که از لحاظ اندازه بزرگترین دسته محسوب و در مراحل انتهایی فرایند مرگ سلولی آزاد می‌گردند (Kotmakçı & Erel Akbaba, 2017). اگزوزوم‌ها، در مایعات بیولوژیکی به طور فراوان حضور دارند و در پلاسما (Caby et al., 2005)، ادرار (Pisitkun et al., 2004)، بزاق، شیر (Lässer et al., 2011)، مایعات دستگاه تنفسی، مایع مغزی- نخاعی، سرم، مایع آمنیوتیک، مایع مفصلی، اشک، لنف، صفرا و اسید معده یافت می‌شوند (Laura M. Doyle & Michael Zhuo Wang, 2019).

اگزوزوم‌ها در داخل سیتوپلاسم سلول‌ها و از جوانه‌زدن غشای اندوزوم به فضای داخلی آن منشأ می‌گیرند. ابتدا با اندوسیتوز، اندوزوم ابتدایی تشکیل می‌شود و سپس بعد از طی روند بلوغ و جوانه زدن غشای آن به سمت فضای داخلی، به اندوزوم فاز تأخیری یا اجسام چند وزیکولی به نام MVB (Multivesicular body) تبدیل می‌شوند. این MVBها یا به لیزوزوم متصل شده و محتویات آن‌ها تخریب می‌شود و یا به غشای سلول متصل شده و محتویات خود که همان اگزوزوم‌ها هستند را به فضای خارج سلولی آزاد می‌کنند (Yang et al., 2019).

همانطور که اشاره شد اگزوزوم‌ها، نانووزیکول‌های خارج سلولی هستند که توسط سلول‌ها ترشح می‌شوند و حامل نوکلئیک اسیدها (miRNA, mRNA, tRNA and DNA)، پروتئین‌ها، لیپیدها و دیگر مواد زیست فعال هستند و در فرآیند-های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن نقش ایفا می‌کنند. از پروتئین‌های شاخص اگزوزوم می‌توان به توبولین، اکتین، CD9، CD82، CD81 و CD63 ، از مهم‌ترین لیپیدها می‌توان به فسفاتیدیل‌کولین، فسفاتیدیل‌سرین و فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین اشاره کرد (Yang et al., 2019). این وزیکول‌ها که دارای غشای دولایه لیپیدی هستند در مقایسه با حامل‌های مصنوعی مانند لیپوزوم‌ها و نانوذرات، مزایای گسترده و منحصر به فردی در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها دارند. تقریباً تمام انواع سلول‌های انسانی می‌توانند اگزوزوم تولید کنند، همانند HUVECs، MSC، سلول‌های T، سلول‌های B، ماکروفاژها، DC، NK (Y. Zhang et al., 2020).

در حال حاضر انواع مختلفی از اگزوزوم‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند؛ به‌عنوان مثال، اگزوزوم‌های مشتق از تومور برای درمان آب‌آوردگی شکم یا آسیت بدخیم (malignant ascites) و اگزوزوم‌های مشتق از دندریتیک سل‌ها برای درمان ملانوما. بنابراین اگزوزوم‌ها پتانسیل زیادی برای کاربردهای بالینی دارند. با این حال برخی معایب، مانند بازده محدود، زمان‌بر بودن و پرهزینه بودن کشت سلول، خطر تحریک سرطان و مشکلات اخلاقی، استفاده از این نوع اگزوزوم‌ها را با مشکلاتی مواجه کرده است. برای رفع این نواقص و موانع، اگزوزوم‌های شیر گاو برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ جداسازی شدند و پس از آن داروهای شیمی‌درمانی داخل این وزیکول‌ها بارگذاری و مراحل درمان انجام شد. داروی بارگذاری شده در اگزوزوم های شیر، اثرات ضدتوموری بهتری در برابر سرطان سینه، ریه و دیگر ارگان‌ها نسبت به داروی آزاد نشان داد (Q. Zhang et al., 2020).

منابع فراوانی ثابت کرده‌اند شیر منبع وسیعی از اگزوزوم است (Bae & Kim, 2021; Melnik et al., 2021; R. Munagala et al., 2016; Sánchez et al., 2021)، در طبیعت به‌وفور یافت می‌شود و به دلیل بی‌خطر بودن، دسترسی آسان، کم‌هزینه بودن (Adriano et al., 2021) و امکان مصرف خوراکی می‌تواند به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرد. دراصل اگزوزوم‌های شیر می‌توانند به‌عنوان حاملی برای عوامل شیمیایی و داروها عمل کنند (Radha Munagala et al., 2016). در مطالعه‌ای اگزوزوم‌های شیر به عنوان حامل داروهای شیمی درمانی به کار گرفته شده است. این داروها بصورت آزاد با دوز بالا دارای اثربخشی هستند که در بسیاری از موارد باعث سمیت سیستمی غیرمنتظره می‌شوند، درصورتی که با بارگذاری آنها در اگزوزوم نه تنها از عوارض سمی این داروها کاسته می‌شود بلکه انتقال آنها به سلول هدف خیلی کارآمدتر به وقوع می پیوندد (Q. Zhang et al., 2020).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

شیر پستانداران، مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، مواد معدنی و چربی‌های مختلف است که نقش مهمی در تغذیه و ایمنی نوزاد دارد. پروتئین‌های کازئین حدود ۸۰ درصد پروتئین‌های شیر گاو را تشکیل می‌دهند. ذرات کلوئیدی و میسل مانند بزرگی از ترکیب کازئین و کلسیم فسفات شکل می‌گیرد و این مسأله در جداسازی اگزوزوم‌ها از شیر مشکل ایجاد می‌کند (Mohd Younus Bhat, 2016). گاهی اگزوزوم‌ها بین این میسل‌ها قرار می‌گیرند و از دسترس خارج می‌شوند. به این منظور باید ابتدا شیر چربی‌زدایی و تا حد امکان کازئین آن حذف گردد.

اخیراً روش‌های متعددی برای جداسازی اگزوزوم مورد بررسی قرار گرفته است؛ مانند اولتراسانتریفیوژ، جداسازی با استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص، روش‌های مبتنی بر پلیمر، میکروفیلتراسیون وکروماتوگرافی. در این پژوهش به بررسی کارایی برخی از این روش ها در جداسازی اگزوزوم از شیر پرداخته شده است.

اولتراسانتریفیوژ به عنوان روش استاندارد طلایی، یکی از متداول‌ترین روش‌های تخلیص اگزوزوم محسوب می‌شود. پیش از انجام اولتراسانتریفیوژ باید با روش‌های مختلف، پروتئین شیر تا حد امکان حذف گردد. مزیت این روش این است که می‌توان با استفاده از آن، انواع وزیکول‌های خارج سلولی را با سرعت های مختلف سانتریفیوژ، جدا نمود. اگزوزوم حدوداً با ۱۰۰۰۰۰ g جداسازی می‌شود (Coughlan et al., 2020). روش متداول بعدی، استفاده از پلیمرها برای رسوب‌دهی اگزوزوم است. برای جداسازی اگزوزوم می‌توان از برخی پلیمرها مانند پلی‌اتیلن-گلیکول (PEG) استفاده کرد. درواقع PEG با وزن‌های مولکولی مختلف برای رسوب‌دادن پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، ویروس‌ها و سایر ذرات کوچک مورداستفاده قرار می‌گیرد. این روش از کاهش حلالیت ترکیبات در محلول‌های پلیمری فوق آبدوست استفاده می‌کند. در این روش با مخلوط‌کردن نمونه و محلول پلیمری و سپس انکوباسیون، رسوب‌دهی وزیکول‌های خارج‌سلولی بااستفاده از سانتریفیوژ با سرعت پایین میسر می‌گردد و نیازی به سانتریفیوژ با سرعت‌های بالا و یا اولتراسانتریفیوژ نیست. همچنین از مزایای غیرقابل‌انکار رسوب اگزوزوم با استفاده از PEG می‌توان به سادگی و امکان کار در محدوده pH فیزیولوژیکی و وابستگی کم به غلظت یون اشاره کرد (Maria Yu Konoshenko et al., 2018). بسیاری از کیت های تجاری جداسازی اگزوزوم هم بر اساس رسوب‌دهی با PEG طراحی شده اند (Tang et al., 2017).

در این پژوهش روش اولتراسانتریفیوژ به دلیل رایج بودن در مطالعات پیشین (Kandimalla et al., 2021; Kanchan Vaswani et al., 2017)، رسوب‌دهی با PEG و برخی کیت‌های تجاری داخلی (که همگی بر مبنای رسوب‌دهی با پلیمر طراحی‌شده‌اند)، به دلیل دردسترس و مقرون‌به‌صرفه بودن، انتخاب گردید و نتایج حاصل با استفاده از تکنیک‌های رایج برای مشخصه‌یابی اگزوزوم با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. هدف از انجام این پژوهش بررسی و مطالعه قابلیت برخی روش‌های متداول و کم هزینه برای جداسازی اگزوزوم از شیر بود. روش اولتراسانتریفیوژ با وجود آن‌که به عنوان روش استاندارد طلایی و یکی از مرسوم‌ترین روش‌های جداسازی اگزوزوم شناخته شده است، به دلیل نیاز به تجهیزات گران قیمت، قابلیت به کارگیری در محصولات تجاری اگزوزوم شیر را نخواهد داشت، بنابراین معرفی روشی ساده، ارزان قیمت و با کارایی بالا می‌تواند محققین این حوزه را به استفاده از اگزوزوم‌های شیر در محصولات آرایشی و دیگر کاربردهای مهم آن تشویق نماید. اساس تمامی کیت‌های مورد مطالعه در این پژوهش، مشابه با روش جداسازی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است. در این روش با ایجاد یک شبکه پلیمری و به دام انداختن وزیکول‌های اگزوزومی در آن، دیگر نیازی به سانتریفیوژ با شدت بسیار بالا (۱۰۰۰۰۰g) نمی‌باشد. از یک طرف به دلیل ساده و ارزان قیمت بودن روش رسوب‌دهی با پلیمر PEG و کیت‌های تجاری انتخاب شده و از طرف دیگر کاربردهای بسیار فراوان اگزوزوم شیر، می‌توان امید داشت در آینده‌ای نزدیک اگزوزوم‌های شیر کاربردهای فراوانی در محصولات آرایشی- بهداشتی و همچنین نانوحامل‌های دارویی پیدا کنند.

مواد و روش‌ها:

مواد و دستگاه:

شیر تازه گاو (شیر خام غیرپاستوریزه) از لبنیات فروشی محلی خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از جمله: HCl، NaOH، PEG 6000 و سایر مواد از شرکت مرک (آلمان)،کیت اگزوسیب از شرکت سیب‌زیست‌فن، کیت آنا - اگزو از شرکت آناسلول‌طب و بافر آماده PBS از شرکت کالازیست تهیه گردید.

قابل ذکر است تمامی سانتریفیوژها با شدت پایین (۱۵۰۰۰g-۳۰۰۰g) با دستگاه شرکت سیگما (مدل 2-16KL، ساخت آلمان) و اولتراسانتریفیوژها (۱۰۰۰۰۰g) با دستگاه Beckman Coulter (ساخت آمریکا) انجام شده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

چربی‌زدایی شیر:

قبل از انجام هر یک از روش‌های جداسازی اگزوزوم، لازم است شیر که نمونه اصلی این پژوهش است، چربی‌زدایی گردد. این عمل برای افزایش بازده جداسازی اگزوزوم ضروری است (Wijenayake et al., 2021). به‌این‌منظور پس از تهیه شیر خام از لبنیات فروشی محلی (شیر با چربی کامل و بدون هیچ تیماری اعم از پاستوریزاسیون یا استریلیزاسیون)، چند مرحله سانتریفیوژ با شدت‌های مختلف اعمال شد تا چربی و برخی سلول‌های مرده از نمونه شیر حذف گردد. ابتدا ۴۰ میلی لیتر شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از اولتراسانتریفیوژ (UC-HCl):

در این روش طبق پروتکل (Yamauchi et al., 2019)، به‌منظور رسوب کازئین از HCl استفاده و این پروتئین حذف شد. در ابتدا پس از چربی‌زدایی شیر خام با سانتریفیوژ ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه، به نمونه با حجم مساوی آب دیونیزه اضافه گردید. سپس با استفاده از HCl یک مولار، pH محلول به ۴/۶ رسانده شد. پس از آن جهت حذف رسوب پروتئینی حاصل، ابتدا مخلوط حاصل با شدت ۹۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس در ۱۰۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه اولتراسانتریفیوژ (شرکت Beckman Coulter، آمریکا) و رسوب اگزوزوم در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PBS حل شد. محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از PEG (PEG):

در این روش برای رسوب‌دهی اگزوزوم از محلول PEG 6000 استفاده گردید. ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

سپس سوپ رویی حاصل از مرحله قبل در یک فالکن جمع‌آوری و به‌منظور حذف ذرات باقیمانده ابتدا از فیلتر ۰/۴ µm و سپس از فیلتر ۰/۲ µm عبور داده شد. محلول ۲۰ درصد PEG 6000 و سوپ رویی حاصل از مرحله چربی‌زدایی و فیلتراسیون، به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. سوپ رویی برداشته و رسوب آن در PBS حل شد. محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از کیت‌های تجاری:

کیت اگزوسیب (Exocib)

در این روش هم همانند روش‌های قبلی به منظور چربی زدایی ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

سپس فیلتراسیون شیر خام با فیلتر ۰/۴µm و سپس با فیلتر ۰/۲µm به‌منظور حذف ذرات باقیمانده انجام شد. برای جداسازی اگزوزوم از محلول شفاف بدست آمده، از کیت اگزوسیب (شرکت سیب زیست فن، ایران) استفاده گردید و تمامی مراحل طبق دستورالعمل کیت دنبال شد و در نهایت محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- نگهداری شد.

کیت آنا اگزو (Anaexo)

در این روش نیز همانند روش‌های قبلی به منظور چربی زدایی ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس فیلتراسیون شیر خام با فیلتر ۰/۴ µm و سپس با فیلتر ۰/۲ µm به‌منظور حذف ذرات باقیمانده انجام شد. برای جداسازی اگزوزوم از محلول شفاف بدست آمده، از کیت آنا اگزو (شرکت آنا سلول طب، ایران) استفاده گردید و تمامی مراحل طبق دستورالعمل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

کیت دنبال شد و در نهایت محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- نگهداری شد.

کیت اگزوسان (Exosun):

در این روش ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و بافر B کیت اگزوسان (شرکت اگزوسان، ایران) با نسبت ۱ به ۴ به سوپ رویی اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل با دور ۹۰۰۰g به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. در این مرحله سوپ رویی به ظرف جدید منتقل شده و بافر A کیت به نسبت ۱ به ۸ به آن افزوده و طبق پروتکل کیت یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شد. سپس برای رسوب دادن اگزوزوم، به مدت نیم ساعت با شدت ۳۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ انجام گردید. رسوب اگزوزوم حاصل در بافر PBS حل شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس برای نگهداری طولانی مدت به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

آماده سازی نمونه‌های حاوی اگزوزوم به‌منظور مشخصه-یابی:

آماده‌سازی به‌منظور انجام تست DLS:

نمونه اگزوزوم پس از ذوب شدن، با استفاده از PBS، ۱۰۰ برابر رقیق و برای انجام تست DLS (دستگاه Zetasizer، شرکت Malvern) آماده‌سازی شد.

آماده‌سازی به‌منظور عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره:

گرید مسی با پوشش کربنی تهیه شد. سپس اگزوزوم های جداسازی‌شده با ۱ میلی لیتر پارافرمالدهید (PFA) ۲درصد به مدت ۵ دقیقه فیکس شد. ۵ تا ۷ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون اگزوزوم روی گرید مسی قرار داده شد و به مدت ۱دقیقه انکوبه شد. سپس بلافاصله با ۲۰ قطره محلول یورانیل استات (UA) ۱٪ فیلترشده، روی سطح گرید توسط سرنگ رنگ آمیزی شد. محلول UA اضافی روی گرید با استفاده از کاغذ صافی برداشته شد. سپس گرید به سرعت با یک قطره آب شسته شد. این مرحله محلول اضافی رنگ را از بین می برد. پس از آن روی گرید با یک ظرف کشت پوشانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شد و سپس عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره (مدل EM10C-100 KV، ساخت شرکت Zeiss، کشور آلمان) صورت گرفت (Jung & Mun, 2018).

آماده‌سازی به‌منظور عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره:

محلول اگزوزوم جداسازی‌شده با ۱ میلی لیتر گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد در محلول ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات (pH =۷) به مدت ۱ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شد. سپس محلول‌های فیکس برداشته شد و نمونه با ۱ میلی لیتر بافر ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات در دمای اتاق شسته شد. این مرحله ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه تکرار شد. نمونه با ۱ میلی لیتر تتروکسید اوسمیم ۲ درصد به مدت ۱ ساعت در دمای ۴درجه سانتی گراد فیکس شد. مجددا محلول‌های فیکس برداشته شد و مانند مرحله ۲ با بافر ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات شسته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه به ترتیب بوسیله اتانول با غلظت‌های مختلف (به ترتیب ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) روی شیکر انکوبه شد. در نهایت به‌منظور تبخیر اتانول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (مدل VEGA3، ساخت شرکت TESCAN، کشور جمهوری چک) انجام شد (Jung & Mun, 2018).

نتایج:

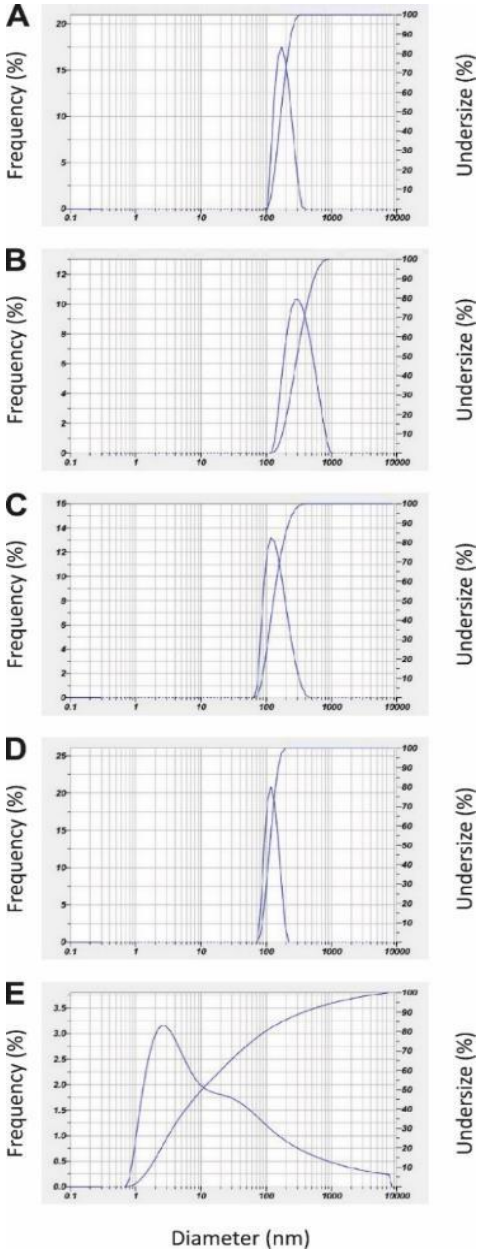
نتایج جداسازی اگزوزوم و اطمینان از صحت و کیفیت جداسازی وزیکول‌ها در این پژوهش با استفاده از روش DLS و میکروسکوپ الکترونی گزارش و درنهایت دو نمودار مقایسه ای مستخرج از نتایج DLS برای PI و میانگین قطر ذرات ارائه شده است.

بررسی اندازه ذرات جداسازی شده با DLS:

با استفاده از روش DLS قطر ذرات جداسازی‌شده و درصد فراوانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ و شکل ۲ قابل مشاهده است، میانگین قطر ذرات جداسازی شده با روش‌های اولتراسانتریفیوژ، کیت اگزوسیب و کیت آنااگزو به ترتیب ۱۷۶، ۱۴۲ و ۱۲۳ نانومتر می‌باشد. در روش جداسازی با PEG، میانگین قطر ذرات بیشتر و ۲۶۳ نانومتر مشاهده گردید (شکل ۲). در نتایج کیت اگزوسان، میانگین قطر ذرات حدود ۱۵۴ نانومتر محاسبه شد (شکل ۲) که با نتایج نمودار حاصل از DLS (شکل ۱) متفاوت است. شکل ۱ حاکی از هتروژن و ریز بودن ذرات جداسازی شده با کیت اگزوسان است.

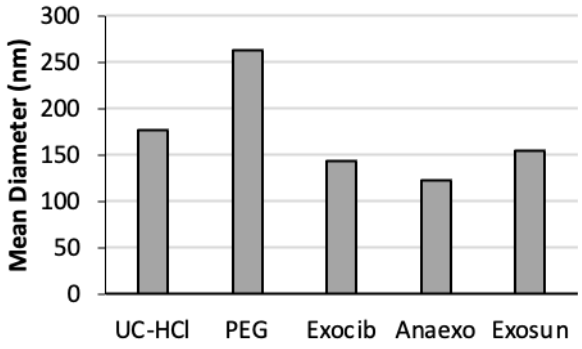
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]



شکل ۱- بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS). سایز و درصد فراوانی ذرات جداسازی‌شده توسط روش‌های A) UC-HCl ، B) PEG، C) Exocib، D) Anaexo، E) Exosun قابل مشاهده است.

Figure 1. Study of isolated exosomes via DLS. The size and frequency percentage of isolated particles via A) UC-HCl, B) PEG, C) Exocib, D) Anaexo, E) Exosun.

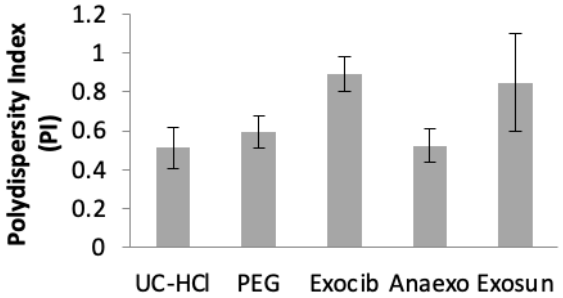


شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین قطر ذرات (Mean Size) در روش‌های مختلف جداسازی اگزوزوم. نمودارها به ترتیب از چپ به راست مربوط به روش‌های UC-HCl، PEG، Exocib، Anaexo و Exosun می‌شوند.

Figure 2. Comparison diagram of mean size in different exosome isolation methods. The diagrams correspond to the methods (in order from the left to right) UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, Exosun.

نمودار مقایسه‌ای PI در روش‌های جداسازی:

شاخص PI (شاخص پراکندگی) براساس هتروژن بودن اندازه ذرات در نمونه، محاسبه و در نتایج DLS ارائه می‌شود. همچنین نتیجه ظاهری این شاخص یعنی هم‌اندازه و هم‌شکل بودن ذرات در نتایج میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است. مقادیر استاندارد برای هموژن بودن (monodisperse) نمونه، بین ۰/۵ تا ۰/۷ و مقادیر بیش از این، نشان‌دهنده هتروژن بودن (polydisperse) سایز و شکل ذرات است. در شکل ۳، نمودار PI بدست آمده از تمامی روش‌ها بصورت ستونی نشان داده شده است که کمترین مقدار مربوط به روش UC-HCl و بیشترین مربوط به Exocib است.



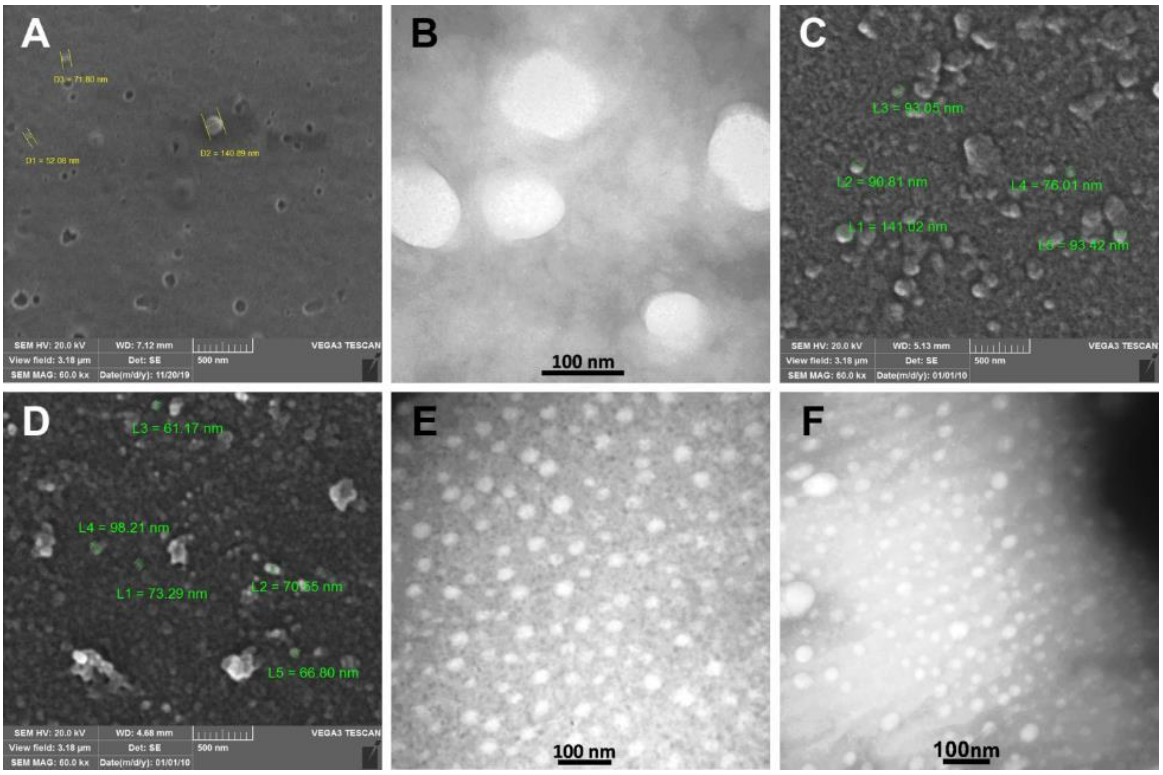
شکل ۳- نمودار مقایسه PI در روش‌های مختلف جداسازی اگزوزوم. این شاخص نمایان‌گر میزان هموژن بودن سایز ذرات نمونه پس از جداسازی است. نمودار ها مربوط به روش‌های (به ترتیب از سمت چپ) UC-HCl، PEG، Exocib، Anaexo، Exosun می‌شوند.

Figure 3. Comparison diagram of PI in different exosome isolation methods. This index shows the degree of homogeneity of sample particle size after isolation. The diagrams correspond to the methods (in order from the left) UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, Exosun.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

مشخصه‌یابی اگزوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی:

نتایج میکروسکوپ الکترونی (شکل ۴) نشان می‌دهد که تمامی روش‌ها در جداسازی اگزوزوم موفق عمل کرده‌اند، چرا کـه ذرات جداسـازی‌شـده، مورفولـوژی و محـدوده سـایزی اگـزوزوم را دارا هستند و همچنین در اغلب روش‌ها تمامیـت غشـای اگـزوزوم‌هـا حفظ شده و ساختار کروی و یا فنجانی شکل قابل مشاهده است. در این تصاویر قطر اگزوزوم‌ها حدوداً بین ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر می باشد، تنها در نتایج کیت اگزوسـان در کنـار ذرات ۵۰ نـانومتری، ذرات بسیار ریزی بین ۲۰ الـی ۳۰ نـانومتر (شـکل F-۴ و E-۴) قابل مشاهده است.



شکل ۴- عکس‌های میکروسکوپ الکترونی اگزوزوم‌های جداسازی‌شده با استفاده از روش‌های مختلف. ذرات گرد و بیضی‌شکل جداسازی‌شده توسط روش‌های UC-HCl (A ، PEG (B ،Exocib (C ،Anaexo (D ،E و Exosun (F. قابل مشاهده است.

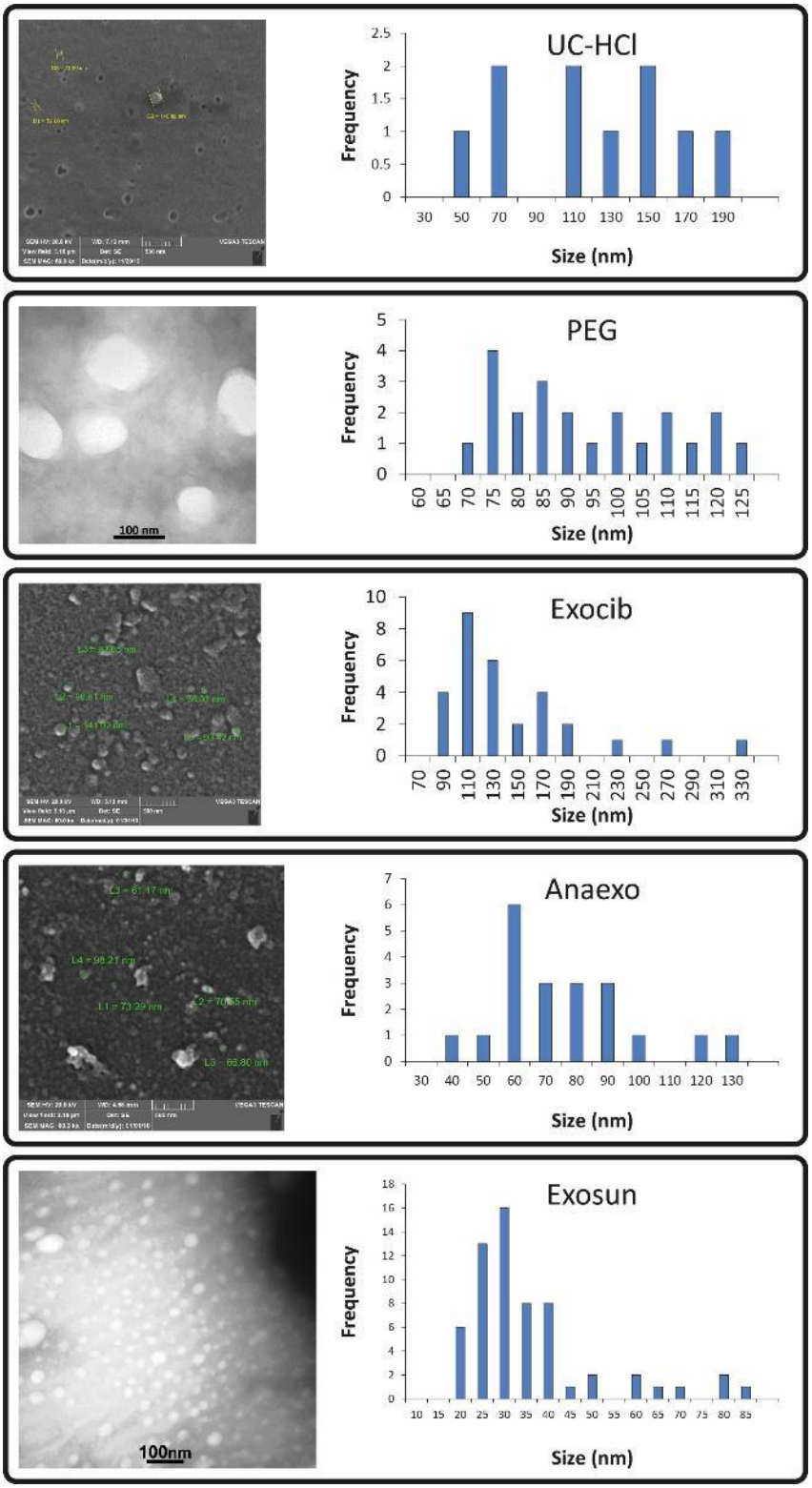
Figure 4. Electron microscopy images of isolated exosomes via various methods. Isolated globular and oval shape particles via methods A) UC-HCl, B) PEG, C) Exocib, D) Anaexo, E,F) Exosun are observable.

.

در شکل ۵ نمودار پراکنـدگی سـایز ذرات در روش‌هـای مختلـف جداسازی قابل مشاهده است. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ آنالیز شده و فراوانی ذرات در اندازه-های مختلف نشان داده شـده اسـت. ذرات بدسـت‌آمـده از همـه روش‌های انجـام شـده در بـازه انـدازه‌ای اگـزوزوم (۳۰ الـی ۱۵۰ نانومتر) قرار دارند و این شاخص، یکی دیگر از شواهد اثبات‌کننده حضـــور اگـــزوزوم در نمونـــه جداســـازی‌شـــده مـــی‌باشـــد

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]



شکل۵- نمودار پراکندگی سایز ذرات (قطر اگزوزوم برحسب نانومتر) در جداسازی با استفاده از روش‌های مختلف. نمودار اول: UC-HCl، نمودار دوم: PEG، نمودار سوم: Exocib، نمودار چهارم: Anaexo و نمودار پنجم : مربوط به کیت اگزوسان (Exosun) است. در نمودارهای هیستوگرام، فراوانی سایزهای مختلف ذرات اگزوزوم قابل مشاهده است.

Figure 5. Comparison diagram of particle size (diameter of exosome in nanometers) in isolation using different kits. The first diagram: UC-HCl, the second diagram: PEG, the third diagram: Exocib, the fourth diagram: Anaexo, and the fifth diagram: is related to the Exosun kit. In the histogram diagrams, the frequency of different sizes of exosome particles can be observe.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

بحث

اگزوزوم‌ها، وزیکول‌های خارج سلولی با اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۵۰ نانومتر هستند که محموله مولکولی پیچیده‌ای را با خود حمل می‌کنند و به سلول‌های گیرنده می‌رسانند و به این ترتیب به عنوان یک سیستم ارتباطی بین سلولی عمل می‌کنند. در واقع می‌توان این‌گونه بیان کرد که اگزوزوم‌ها نانوحامل‌های زیستی هستند که به خوبی نقش خود را در انتقال مواد زیستی مختلف در درون موجودات ایفا می‌کنند. امروزه محققین در جستجوی به‌کارگیری این نانووزیکول‌ها در سیستم‌های دارورسانی هستند (Chen et al., 2021). با وجود تمامی مزایایی که اگزوزوم‌ها به عنوان حامل دارویی با خود همراه دارند، ولی دو مشکل اساسی باعث شده تا کنون چندان در حوزه درمان موفق ظهور نکنند؛ یکی پر هزینه بودن تولید انبوه اگزوزوم از سلول‌های انسانی و دیگری عدم دست‌یابی به یک روش کارآمد و به‌صرفه برای جداسازی اگزوزوم (Yakubovich et al., 2022). امروزه با شناسایی و جداسازی موفقیت‌آمیز اگزوزوم‌های فراوان از شیر انسان و دیگر حیوانات، به عنوان یک منبع ارزان و دردسترس برای تولید اگزوزوم، این امید در ذهن محققین نقش بسته است که می‌توان به تجاری‌سازی این نانوساختارهای زیستی اندیشید. در این مطالعه هدف بر آن بود با مقایسه کارآمدی چند کیت داخلی برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو و مقایسه نتایج آن با روش استاندارد اولتراسانتریفیوژ، روشی ساده و مقرون‌به‌صرفه برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو معرفی گردد. مشکل اصلی در مورد جداسازی اگزوزوم از شیر، حضور نانومیسل‌های چربی و مقادیر زیاد میسل‌های کازئین است که در امر جداسازی تداخل ایجاد می‌کند (Benmoussa et al., 2020) و بنابراین هر روشی بتواند این مشکل را مرتفع سازد، می‌تواند به عنوان روشی کارآمد برای تخلیص اگزوزوم از منابع مختلف شیر مطرح گردد. در این پژوهش، روش‌های اولتراسانتریفیوژ، رسوب‌دهی با PEG، کیت تجاری اگزوسیب، کیت تجاری آنااگزو و کیت اگزوسان برای جداسازی اگزوزوم شیر مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که اساس تکنیک جداسازی در تمامی این کیت‌ها یکسان و مشابه رسوب‌دهی با PEG است، بنابراین می‌توان به راحتی به مقایسه آنها پرداخت.

در پژوهش‌های انجام‌شده متداول‌ترین روش، اولتراسانتریفیوژ است که در اغلب موارد از بازده بالایی نیز برخوردار است ولی روشی مقرون‌به‌صرفه و دردسترس نیست. در پژوهشی برای افزایش کارایی این روش از رسوب اسیدی به‌منظور حذف پروتئین‌های شیر استفاده شد و در نهایت مقایسه نتایج روش اولتراسانتریفیوژ و روش رسوب اسیدی به‌همراه اولتراسانتریفیوژ، نشان داد که اگزوزوم‌ها در روش رسوب اسیدی مانند روش اولتراسانتریفیوژ به خوبی و بدون شکسته شدن دیواره جدا شدند و ویژگی‌های مورفولوژیکی این وزیکول‌ها کاملاً شبیه روش اول بود با این تفاوت که بعضی از اگزوزوم‌ها در رسوب اسیدی، سطح ناهمواری داشتند که می‌تواند به دلیل اثر pH پایین بر پروتئین-های سطحی اگزوزوم باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که اگزوزوم‌ها با استفاده از روش رسوب اسیدی بدون تخریب جدی جدا شدند و این روش می‌تواند جایگزین اولتراسانتریفیوژ به تنهایی شود. از طرفی در این روش حذف کازئین که یکی از مراحل مهم در جداسازی اگزوزوم شیر است به خوبی صورت گرفت (Yamauchi et al., 2019). در پژوهش حاضر نیز با الگوبرداری از روش استفاده‌شده در منبع ذکرشده، ابتدا کازئین شیر با کاهش pH حذف و اگزوزوم آن با استفاده از اولتراسانتریفیوژ جداسازی شد. شواهد میکروسکوپ الکترونی نشان داد که مورفولوژی ذرات جداشده با اگزوزوم مطابقت دارد و همچنین نتایج بدست آمده از تکنیک DLS محدوده سایزی اگزوزوم را تأیید نمود. از لحاظ هتروژن بودن سایز و شکل ذرات، اگزوزوم‌های جداشده با UC-HCl یکسان‌تر ولی از تراکم کمی برخوردار بودند (شکل ۲). از آنجایی که نتایج مطالعه ذکرشده، تأیید کرده است که تیمار با HCl تأثیری بر ساختار اگزوزوم‌ها و تخریب آنها ندارد، بنابراین ممکن است آماده‌سازی نمونه برای عکسبرداری در این مسأله دخیل بوده که اگزوزوم‌های کمتری جداسازی شده است.

در پژوهشی دیگر، اگزوزوم‌های شیر گاو و انسان با استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ و size exclusion chromatography جداسازی شدند. پس از جداسازی، غلظت اگزوزوم‌های هر دو روش با استفاده از NTA، و مورفولوژی ذرات با استفاده از TEM، و در نهایت با استفاده از ایمونوبلات و طیف‌سنجی جرمی، حضور نشانگرهای اگزوزومی ارزیابی شدند. ویژگی‌های اصلی مورفولوژی اگزوزوم‌ها یعنی کروی یا دونات شکل‌بودن، وجود نشانگرهای اگزوزومی مانند FLOT-1، CD9، CD81 و تعداد بالای ذرات در اگزوزوم‌های شیر انسان و گاو تأیید شد (Vaswani et al., 2019).

در مطالعه‌ای دیگری به‌منظور افزایش بازدهی، از اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی برای جداسازی اگزوزوم استفاده شده است. در این روش، جداسازی اگزوزوم‌ها بر اساس اندازه، جرم و چگالی آنها در یک محیط گرادیان چگالی از پیش ساخته شده در یک لوله سانتریفیوژ با کاهش تدریجی چگالی از پایین به بالا انجام می‌شود. برخلاف اولتراسانتریفیوژ افتراقی، نقطه ضعف اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی این است که

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

ظرفیت آن تا حد زیادی توسط ناحیه بارگذاری باریک، محدود شده است (K. Vaswani et al., 2017). با وجود آنکه میزان خلوص در این روش بالاتر رفته است، ولی از اشکالات مهم این روش می‌توان نیاز به حجم بالای نمونه (محدوده میلی لیتر تا لیتر)، آسیب یا تجمع اگزوزوم (به ویژه اگزوزوم‌هایی که از محلول‌های بسیار ویسکوز مانند شیر منشأ می‌گیرند)، آلودگی لیپوپروتئینی (لیپیدهایی با چگالی بالا (HDLs) و مشابه با اگزوزوم) برشمرد. این روش همچنین می‌تواند بسیار پرزحمت و زمان‌بر باشد (ممکن است بیش از ۲۴ ساعت طول بکشد) و درصمن خروجی و بازدهی کمی هم داشته باشد (Wijenayake et al., 2021).

اولتراسانتریفیوژ، پرکاربردترین روش برای استخراج اگزوزوم بوده است اما محدودیت‌هایی همانند نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و زمان‌بر بودن، استفاده از آن را محدود کرده است (Helwa et al., 2017; Li et al., 2022). به همین منظور روش رسوب پلیمری می‌تواند جایگزین مناسبی برای این روش قرار گیرد. در این روش پلیمرهایی همچون پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) با ایجاد شبکه و به دام انداختن تعداد زیادی ذرات اگزوزومی، شرایط را برای رسوب‌دهی در شدت دور پایین توسط سانتریفیوژ را فراهم می‌سازد و به این ترتیب نیاز به دستگاه اولتراسانتریفیوز مرتفع می‌گردد. به این ترتیب، روش بعدی که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت، جداسازی با استفاده از پلیمر PEG 6000 بود. ذرات وزیکولی ۱۰۰ نانومتری جدا شده توسط PEG در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، مشاهده شدند. از آنجایی که پلیمر PEG در غلظت‌های بالا توانایی رسوب دادن پروتئین را هم داراست، بنابراین احتمال آلودگی به پروتئین در چنین روش‌هایی افزایش می‌یابد. در پژوهشی که اگزوزوم‌های سرم با استفاده از روش‌های متفاوت از جمله کیت‌های تجاری (بر اساس رسوب-دهی با PEG) تخلیص شدند، به این نکته اشاره شده است که PEG می‌تواند باعث رسوب ذرات غیراگزوزومی سرم هم شود (Helwa et al., 2017). جداسازی وزیکول‌های خارج سلولی می‌تواند با رسوب همزمان نوکلئوپروتئین‌ها و پروتئین‌های غیراگزوزومی مانند آلبومین، آپولیپوپروتئین E و همچنین ایمونوگلوبولین‌ها و کمپلکس‌های ایمنی همراه باشد (M. Y. Konoshenko et al., 2018). در نتیجه در مورد شیر که حاوی مقادیر زیادی از پروتئین و میسل‌های چربی است، نیز می‌توان چنین اتفاقی صورت گیرد.

از مزایای غیرقابل انکار تخلیص وزیکول‌ها با PEG می‌توان به سادگی، سرعت و همچنین امکان کار در محدوده pH فیزیولوژیکی و وابستگی ضعیف به غلظت یون اشاره کرد. از کیت‌های تجاری که در حال حاضر در دنیا بر اساس رسوب‌دهی با PEG یا پلیمرهای دیگر به فروش می‌رسند، می‌توان به مواردی همچون کیت ExoQuick (شرکت System Biosciences ایالات متحده)، کیت جداسازی اگزوزوم تام (شرکت Invitrogen، ایالات متحده)، کیت ExoPrep (شرکت HansaBioMed استونی)، کیت خالص‌سازی اگزوزوم (شرکت Norgenadaek کانادا) و کیت جداسازی miRCURY (شرکت Exiqon دانمارک) اشاره کرد. مقدار و کیفیت اگزوزوم‌ها و microRNA جدا شده با استفاده از محلول آماده شده PEG 6000 می‌تواند تا حدودی با کیت‌های تجاری برابری کند، اما هزینه روش به طور قابل توجهی کمتر است. این روش ساده، سریع و مقیاس پذیر است. همین عوامل، این روش را برای تحقیقات بالینی جذاب‌تر می‌کند. با این حال، همانطور که پیش‌تر اشاره شد روش پلی‌مری معایبی نیز دارد که مهم‌ترین آن آلودگی متغیر نمونه با پروتئین‌ها، کمپلکس‌های پروتئینی، لیپوپروتئین‌ها، نوکلئوپروتئین‌ها و همچنین ذرات ویروسی است (M. Y. Konoshenko et al., 2018).

در پژوهشی از کیت اگزوکوئیک که یکی از رایج‌ترین کیت‌های تجاری تخلیص اگزوزوم به شمار می‌رود و اساس آن هم رسوبدهی با پلیمر PEG است، به‌منظور جداسازی اگزوزوم شیر استفاده شده است. نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های جداسازی شده با این روش نسبت به روش اولتراسانتریفیوژ تغییر ساختاری قابل ملاحظه‌ای داشته است (Wijenayake et al., 2021). همچنین در مطالعه ای دیگری که از کیت اگزوکوئیک برای جداسازی اگزوزوم از شیر استفاده شده، نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که مورفولوژی ذرات اگزوزوم تا حدودی تغییر کرده ولی بطور کلی این کیت به عنوان روشی سریع و با بازده بالا برای جداسازی اگزوزوم شیر ارزیابی شده است (Yamada et al., 2012).

در پژوهش حاضر، سه کیت تجاری داخلی که بر اساس رسوبدهی با پلیمر طراحی شده‌اند، مورد ارزیابی قرار گرفت. قابل ذکر است که هر سه کیت برای اولین بار در این پژوهش به‌منظور جداسازی اگزوزوم از شیر گاو به کار گرفته شده‌اند. همانطور که در پیش اشاره گردید، یکی از مرسوم‌ترین روش‌های به کار رفته در کیت‌های تجاری، رسوب‌دهی با پلیمر است. ساده و کم‌هزینه-بودن این روش، دلیل مهم دیگری است که امروزه به عنوان روشی برای جداسازی اگزوزوم در مقیاس وسیع مورد توجه قرار گرفته است. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، مربوط به اگزوزوم‌های جداسازی شده با کیت اگزوسیب، آنااگزو و اگزوسان، فراوانی بالایی از وزیکول‌ها قابل مشاهده است. در مورد کیت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

اگزوسان با وجود مشاهده ذرات بسیار منظم و یکدست، محدوده سایزی اگزوزوم‌های جداسازی‌شده کوچک‌تر از دو کیت دیگر و همچنین کوچک‌تر از اگزوزوم‌های جداسازی شده با روش اولتراسانتریفیوژ و رسوب‌دهی با PEG می‌باشد (شکل۴ و ۵). مشاهده اگزوزوم‌هایی با اندازه کوچکتر از ۳۰ نانومتر در مطالعات دیگران هم سابقه داشته است. طبق گزارش‌های مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، در نتایج اگزوزوم‌های جداسازی شده از رده سلولی COLO 205، وزیکول‌های بسیاری با سایز کوچک‌تر از ۳۰ نانومتر به خوبی قابل مشاهده است (Dash et al., 2021). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ هم ذراتی با اندازه کوچک از سلول های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون جداسازی شده است (Chopra et al., 2019).

در این پژوهش دو تکنیک رایج جهت مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها، روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی، برای مقایسه روش‌های مختلف جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. همانگونه که در بخش نتایج هم به آن اشاره گردید، در برخی موارد نتایج DLS با تصاویر میکروسکوپی همخوانی نداشت؛ به طور مثال، در روش رسوبدهی PEG نتایج DLS نشان‌دهنده بزرگ‌بودن ذرات جداسازی شده بود (میانگین قطر ذارت= ۲۶۳ نانومتر)، در صورتی که تصاویر میکروسکوپی ذراتی با سایز بین ۷۰ الی ۱۲۰ نانومتر را نشان می‌داد. همین طور در مقایسه نتایج DLS و تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان مشخص است که DLS توانایی شناسایی ذرات ریز در حضور ذرات درشت را به خوبی ندارد. این مسأله به اساس این تکنیک برمی‌گردد. در تکنیک DLS، اندازه ذرات از نوسانات شدت نور پراکنده شده ناشی از حرکت براونی ذرات در محلول تعیین می‌شود. این واقعیت که شدت نور پراکنده شده متناسب با توان ششم قطر ذره است، این تکنیک را نسبت به حضور ذرات بزرگ بسیار حساس می‌کند. اگر هدف شناسایی مقادیر بسیار کم ذرات درشت باشد (به طور مثال، شناسایی تجمع ذرات و ناپایداری آنها)، این توانایی می‌تواند یک مزیت باشد، اما در عین حال می‌تواند یک اشکال بزرگ برای تعیین دقیق اندازه در محلول‌های هتروژن (حاوی ذرات ریز در کنار ذرات درشت‌تر هستند) باشد (Filipe et al., 2010). در این حالت به دلیل حساس بودن تکنیک به ذرات درشت‌تر، با وجود ناچیز بودن این ذرات در کنار ذرات ریز، میانگین اندازه ذرات، خیلی بیشتر از واقعیت برآورد خواهد شد. از آنجایی که اندازه ذرات در تصاویر میکروسکوپی با توجه به مقیاس درج شده در تصاویر به خوبی قابل محاسبه است، بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد، با وجود سهولت و حساسیت بالای تکنیک DLS، برای مشخصه-یابی اگزوزوم‌ها، عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی نتایج مطمئن‌تری در اختیار محقق قرار می‌دهد. به این ترتیب نتایج حاصل از این پژوهش متکی بر اطلاعات بدست آمده از تصاویر میکروسکوپی در جدول ۱ به طور خلاصه بیان شده است.

همانگونه که مشخص است بازدهی کیت‌های تجاری بیشتر از روش اولتراسانتریفیوژ بوده است. البته این امکان وجود دارد که آلودگی پروتئینی در روش‌های رسوب‌دهی با پلیمر (کیت های تجاری استفاده شده در این پژوهش) بیشتر از روش اولتراسانتریفیوژ باشد که در این مطالعه به آن پرداخته نشده است ولی در هر صورت می‌توان امید داشت با مطالعات کامل‌تر در این خصوص و رفع نواقص احتمالی، روش رسوب‌دهی پلیمری به عنوان یک انتخاب مناسب برای تولید انبوه اگزوزوم در مصارف تجاری، مورد استفاده قرار گیرد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

جدول ۱- مقایسه روش‌های جداسازی اگزوزوم شیر بر اساس نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی و تکنیک DLS

Table1.Comparision of milk exosomal separation methods based on the results of electronic micrroscope and DLS techniques

روش جداسازی	اساس تکنیک	محدوده سایز ذرات*	شاخص پراکندگی (PI**)	تراکم ذرات در تصاویر میکروسکوپی
اولتراسانتریفیوژ (UC-HCl)	جداسازی بر اساس سایز و چگالی	۱۹۰-۵۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷- ۰/۵)	پایین
رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)	تشکیل شبکه پلیمری و تجمع ذرات	۱۲۰-۷۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷- ۰/۵)	پایین
کیت تجاری اگزوسیب (Exocib)	رسوب‌دهی با پلیمر	۲۰۰-۹۰ نانومتر	نامناسب (≥۰/۷)	بالا
کیت تجاری آناگزو (Anaexo)	رسوب‌دهی با پلیمر	۱۳۰-۴۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷- ۰/۵)	بالا
کیت تجاری اگزوسان (Exosun)	رسوب‌دهی با پلیمر	۸۰-۲۰ نانومتر	نامناسب (≥۰/۷)	بالا

* بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی محاسبه گردیده است.

** بر اساس نتایج DLS محاسبه گردیده است. شاخص پراکندگی یک پارامتر نسبی است و برای محلول‌های هتروژنی مثل اگزوزوم (حاوی ذرات با سایزهای متفاوت)، بالا بودن مقدار آن (≥۰/۷) محتمل است.

نتیجه‌گیری:

بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که هر چند روش اولتراسانتریفیوژ یکی از رایج‌ترین روش‌های جداسازی اگزوزوم به حساب می‌آید ولی به دلیل پرهزینه‌بودن و نیاز به تجهیزات ویژه، همچنان روش‌های رسوب‌دهی با پلیمر می‌تواند گزینه مناسبی برای جداسازی اگزوزوم از شیر به شمار روند. با وجود آنکه احتمال آلودگی پروتئینی در روش‌های رسوب‌دهی با پلیمر (اغلب کیت‌های تجاری تخلیص اگزوزوم) وجود دارد ولی اگر هدف تولید وسیع و استفاده صنعتی از اگزوزوم‌های شیر به عنوان یک نانوحامل دارویی مدنظر باشد، بهینه‌ترین روش تخلیص، همین روش محسوب می‌شود. بنابراین لازم است مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم رسوب‌دهی اگزوزوم‌ها با پلیمرها و عوامل دخیل در آن صورت گیرد تا بتوان میزان آلودگی پروتئینی را به حداقل رساند و یا به طور کامل حذف کرد. در این صورت می‌توان امیدوار بود که اگزوزوم‌های شیر در آینده‌ای نزدیک جایگاه ویژه‌ای در نانوحامل دارویی در حوزه درمان برای خود باز خواهند کرد.

Abbreviation
HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells
MSC: Mesenchymal stem cells
DC: Dendritic cells
NK: Natural killer cells
PEG: polyethyleneglycol
PBS: Phosphate buffered saline
PFA: Paraformaldehyde
UA: Uranyl acetate
PI: Polydispersity index
NTA: nanoparticle tracking analysis

سپاسگزاری:

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه الزهرا(س) جهت در اختیارگذاشتن تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی برای پیشبرد اهداف این پژوهش، اعلام می‌دارند

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

REFERENCES:

Adriano, B., Cotto, N. M., Chauhan, N., Jaggi, M., Chauhan, S. C., & Yallapu, M. M. 2021. Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications. Bioactive Materials 6: 2479-2490.

Bae, I. S., & Kim, S. H. 2021. Milk Exosome-Derived MicroRNA-2478 Suppresses Melanogenesis through the Akt-GSK3β Pathway. Cells 10.

Benmoussa, A., Michel, S., Gilbert, C., & Provost, P. 2020. Isolating Multiple Extracellular Vesicles Subsets, Including Exosomes and Membrane Vesicles, from Bovine Milk Using Sodium Citrate and Differential Ultracentrifugation. Bio Protoc 10: e3636.

Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. International Immunology 17: 879-887.

Chen, H., Wang, L., Zeng, X., Schwarz, H., Nanda, H. S., Peng, X., & Zhou, Y. 2021. Exosomes, a New Star for Targeted Delivery. Front Cell Dev Biol 9: 751079.

Chopra, N., Dutt Arya, B., Jain, N., Yadav, P., Wajid, S., Singh, S. P., & Choudhury, S. 2019. Biophysical Characterization and Drug Delivery Potential of Exosomes from Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. ACS Omega 4: 13143-13152.

Coughlan, C., Bruce, K. D., Burgy, O., Boyd, T. D., Michel, C. R., Garcia-Perez, J. E., . . . Potter, H. 2020. Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. Current protocols in cell biology 88: e110-e110.

Dash, M., Palaniyandi, K., Ramalingam, S., Sahabudeen, S., & Raja, N. S. 2021. Exosomes isolated from two different cell lines using three different isolation techniques show variation in physical and molecular characteristics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1863: 183490.

Doyle, L. M., & Wang, M. Z. 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. Cells 8: 727.

Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. Pharm Res 27: 796-810.

Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., . . . Liu, Y. 2017. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. PLoS One 12: e0170628.

Jung, M. K., & Mun, J. Y. 2018. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. Journal of visualized experiments : JoVE: 56482.

Kandimalla, R., Aqil, F., Tyagi, N., & Gupta, R. 2021. Milk exosomes: A biogenic nanocarrier for small molecules and macromolecules to combat cancer. 85: e13349.

Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. BioMed research international 2018: 8545347.

Kotmakçı, M., & Erel Akbaba, G. (2017). Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? In (pp. 163-182).

Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., . . . Valadi, H. 2011. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. Journal of Translational Medicine 9: 9.

Li, W.-J., Chen, H., Tong, M.-L., Niu, J.-J., Zhu, X.-Z., & Lin, L.-R. 2022. Comparison of the yield and purity of plasma exosomes extracted by ultracentrifugation, precipitation, and membrane-based approaches. Open Chemistry 20: 182-191.

Melnik, B. C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S. M., & Schmitz, G. 2021. Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. Biomolecules 11.

Mohd Younus Bhat, T. A. D. a. L. R. S. (2016). Casein Proteins: Structural and Functional Aspects, Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects,.

Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., & Gupta, R. C. 2016. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. Cancer letters 371: 48-61.

Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]

2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 13368-13373.

Sánchez, C., Franco, L., Regal, P., Lamas, A., Cepeda, A., & Fente, C. 2021. Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. Nutrients 13.

Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., An, T.-X., . . . Wang, Q. 2017. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. International journal of molecular medicine 40: 834-844.

Vaswani, K., Koh, Y. Q., Almughlliq, F. B., Peiris, H. N., & Mitchell, M. D. 2017. A method for the isolation and enrichment of purified bovine milk exosomes. Reproductive Biology 17: 341-348.

Vaswani, K., Mitchell, M. D., Holland, O. J., Qin Koh, Y., Hill, R. J., Harb, T., . . . Peiris, H. 2019. A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk. Journal of Nutrition and Metabolism 2019: 5764740.

Wijenayake, S., Eisha, S., Tawhidi, Z., Pitino, M. A., Steele, M. A., Fleming, A. S., & McGowan, P. O. 2021. Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. PLoS One 16: e0257633.

Yakubovich, E. I., Polischouk, A. G., & Evtushenko, V. I. 2022. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol 16: 115-126.

Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T., & Ishiguro, N. 2012. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. J Vet Med Sci 74: 1523-1525.

Yamauchi, M., Shimizu, K., Rahman, M., Ishikawa, H., Takase, H., Ugawa, S., . . . Inoshima, Y. 2019. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. Drug Development and Industrial Pharmacy 45: 359-364.

Yang, X.-X., Sun, C., Wang, L., & Guo, X.-L. 2019. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. Journal of Controlled Release 308: 119-129.

Zhang, Q., Xiao, Q., Yin, H., Xia, C., Pu, Y., He, Z., . . . Wang, Y. 2020. Milk-exosome based pH/light sensitive drug system to enhance anticancer activity against oral squamous cell carcinoma. RSC Adv 10: 28314-28323.

Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. 2020. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. Int J Nanomedicine 15: 6917-6934.

Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., & Sundstrom, J. M. (2020). Chapter 2 - Methods for exosome isolation and characterization. In L. Edelstein, J. Smythies, P. Quesenberry, & D. Noble (Eds.), *Exosomes* (pp. 23-38): Academic Press.

*****

How to cite this article:

Ghandchi.H, Ramezani, R., Moosavinejad, Z. 2024**.** Investigating the inhibitory effect of new imidazole derivatives on cyclooxygenase II enzyme with computational approach. Nova Biologica Reperta 10: 22-40. (In Persian).

قندچی، ح. رمضانی،ر و موسوی نژاد، س.ز. ۱۴۰۲. بررسی مقایسه ای چند روش آزمایشگاهی برای جداسازی اگزوزوم های شیر گاو. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۲۲-۴۰.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.61186/nbr.10.4.27]