وزیکول‌های خارج سلولی و کاربردهای درمانی آن‌ها: یک مقاله مروری

رضا رهبرقاضی[۱]، جعفر رضایی[۲*]

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۲/۰۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: وزیکول‌های خارج سلولی وزیکول‌های با دولایه غشای فسفولیپیدی هستند که از سلول‌های مختلف ترشح می‌شوند. این ذرات حاوی مولکول‌های زیستی مثل mRNA، miRNA، DNA، پروتئین و لیپید هستند و نقش مهمی در برقراری ارتباطات سلولی دارند و متعاقب رسیدن به سلول‌های هدف موجب تغییر در عملکرد، سرنوشت، مورفولوژی، تمایز و رشد می‌شوند. مطالعه حاضر از نوع مروری است که با هدف بررسی مکانیسم مولکولی درگیر در تشکیل اگزوزوم‌ها و کاربرد درمانی آن‌ها صورت گرفته است.

مواد و روش کار: مطالعه مروری حاضر از مقالات چاپ‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتیScopus ، ISI و Pubmed استفاده شده است. کلمات کلیدی به کاربرده شده شامل extracellular vesicles، exosome، ESCRT، MVB بود. تعداد ۱۱۸ مقاله مرتبط و دربرگیرنده تحقیقات از سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۸ بود، موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: اگزوزوم‌ها (نانووزیکول‌های به‌اندازه ۳۰-۱۲۰ نانومتر) یکی از اعضای خانواده وزیکول‌های خارج سلولی هستند که توسط بیشتر سلول‌ها ترشح می‌شوند. مکانیسم‌های مولکولی پیچیده در تشکیل، ترشح و جذب شدن این وزیکول‌ها دخالت دارند. مطالعات نشان می‌دهد که اگزوزوم‌ها نقش بسیار مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک دارند. یافته‌ها حاکی از آن است که اگزوزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی، حامل انتقال عوامل درمانی بخصوص در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها مورداستفاده قرار بگیرند.

بحث و نتیجه‌گیری: اگزوزوم‌ها نقش بسیار مهمی در تنظیم فرایندهای زیستی دارند. آن‌ها می‌توانند به‌عنوان ابزاری در زمینه شناسایی و درمان بیماری‌های مختلف کاربرد داشته باشند. باوجود پیشرفت در زمینه زیست‌شناسی و کاربرد اگزوزوم‌ها، هنوز سؤالات زیادی در مورد کاربرد آن‌ها وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: وزیکول‌های خارج سلولی، اگزوزوم، نشانگر زیستی، حامل دارو

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره سوم، ص ۲۰۶-۱۸۷، خرداد ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: ارومیه، بلوار ارشاد، خیابان شفا، پژوهشکده پزشکی سلولی مولکولی، طبقه سوم، مرکز تحقیقات سالید تومور. کد پستی ۵۷۱۴۷، صندوق پستی ۱۱۳۸، فاکس: ۰۴۴۳۲۲۲۲۰۱۰ تلفن: ۰۹۱۴۸۵۴۸۵۰۳

Email: J.rezaie88@gmail.com

مقدمه

سلول‌های مختلف از طریق راه‌های متعددی باهم دیگر ارتباط برقرار می‌کنند. در یک ریزمحیط زیستی سلول‌ها برای برقراری ارتباطات از سازوکارهای متعددی مثل روش‌های پاراکراین، جاکستاکراین[1] و اتوکراین استفاده می‌کنند (۱). در دهه اخیر دانشمندان با مطالعه سلول‌ها متوجه شدند که سلول‌ها علاوه بر این‌که فاکتورهای محلول ترشح می‌کنند، یک سری نانووزیکول‌های بنام اگزوزوم تولید می‌کنند و از طریق آن‌ها با سلول‌های مجاور و دور ارتباط برقرار می‌کنند. بنابراین اگزوزوم‌ها یک روش دیگری در برقراری ارتباطات سلولی هستند (۲). در ابتدا تصور بر این بود که تولید اگزوزوم نوعی روش برای دفع مواد زائد داخل سلولی است (۳). ولی بعدازآن نقش مهم اگزوزوم‌ها در فرایندهای زیستی طبیعی و غیرطبیعی به اثبات رسید (۴، ۵). این وزیکول‌ها جزو خانواده وزیکول‌های خارج سلولی[2] هستند. وزیکول‌های خارج سلولی ازنظر

۱ استادیار، پاتولوژی، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲ استادیار، علوم سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات سالید تومور، پژوهشکده پزشکی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

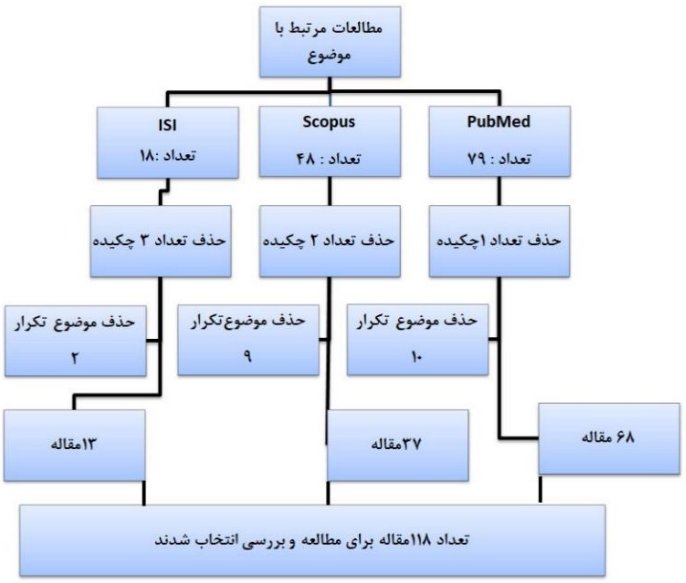
1 Juxtacrine

2 Extracellular Vesicles

اندازه و منشأ دسته‌بندی می‌شوند (۶). اگزوزوم‌ها کوچک‌ترین عضو این خانواده بوده و از طریق مسیر اندوسیتوز ساخته می‌شوند. مولکول‌های متعددی در ساخته‌شدن، انتقال داخل سلولی و ترشح آن‌ها درگیر هستند. مکانیسم‌های متعددی در ساخته شدن و بارگیری آن‌ها شناسایی شده است (۶). این وزیکول حاوی انواع مولکول‌های زیستی مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و لیپید هستند و به دنبال آزاد شدن به محیط خارج سلولی به سلول‌های هدف می‌رسند. به دلیل اینکه این وزیکول‌ها حاوی مولکول‌های زیستی هستند، بعد از رسیدن به سلول‌های هدف موجب تغییرات در سرنوشت و عملکرد آن سلول‌ها می‌شوند (۷). محققین بر این باورند که اگزوزوم‌ها می‌توانند در زمینه‌های پزشکی مثل نشانگرهای زیستی، حامل‌های زیستی و ژن‌درمانی مورد استفاده قرار گیرند (۸). استفاده از اگزوزوم‌ها در کارآزمایی‌های بالینی در حال افزایش است و محققین در این زمینه سعی دارند رفتار و زیست‌شناسی اگزوزوم‌ها را در شرایط پاتولوژیک در بیماران موردمطالعه قرار دهند. به‌طورکلی جهت‌گیری مطالعات در این آزمایش‌ها به سمت استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی و حامل دارو در بیماری‌های مختلف به‌خصوص سرطان است(۹). در این مقاله مروری ما به بررسی مولکولی مسیر ترشحی اگزوزوم‌ها می‌پردازیم. علاوه بر این کاربرد اگزوزوم‌ها در پزشکی و روش‌های استفاده از اگزوزوم‌ها در مدل‌های آزمایشگاهی موردبحث و بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

روش مطالعه حاضر از نوع مروری ساده است و بازه زمانی ۳ ماه (آذر تا بهمن سال ۱۳۹۷) انجام شده است. در این مطالعه از مقالات مربوط به مطالعات توصیفی و تحلیلی نمایه شده در پایگاه‌های اطلاعاتی Scopus، ISI و Pubmed استفاده شده است. در Scientific Information Databaseجستجوی مقالات، کلمات کلیدی به کاربرده شده شامل extracellular vesicles، exosome، ESCRT، MVB بود. معیار اولیه انتخاب مقالات، ارتباط آن با اگزوزوم‌ها و وجود یکی از کلیدواژه‌ها بود. به‌طورکلی در این بررسی مجموعه مقالات مطالعه شده شامل ۱۴۵ مقاله می‌شد که درنهایت ۱۱۸ مقاله برای این منظور مناسب در نظر گرفته شد (شکل ۱). معیارهای ورود یا خروج مطالعات شامل موارد زیر بود: ۱- مقاله‌ها در بازه زمانی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۸ باشند.۲-مقالات از نوع تحقیقی و مروری باشند.۳-مقالات دارای متن کامل و قابل‌دسترس باشند.



شکل (۱): استراتژی جستجو در پایگاه‌های منتخب بین سال‌های ۲۰۰۰-۲۰۱۸ و شناسایی مقالات نهایی

وزیکول‌های خارج سلولی:

وزیکول‌های خارج سلولی جمعیتی ناهمگنی از وزیکول‌های کوچک دولایه فسفولیپیدی هستند که از سلول‌های مختلف بدن مثل سلول‌های ایمنی، گلبول‌های قرمز، پلاکت، سلول‌های سرطانی، سلول‌های بنیادی و سایر سلول‌های بدن ترشح می‌شوند. این وزیکول‌ها، مولکول‌های زیستی فراوانی مثل پروتئین، DNA، انواع RNA و لیپید حمل می‌کنند و به‌عنوان حامل‌های زیستی شناخته شده‌اند (۱۰، ۱۱). دانشمندان ۳ نوع وزیکول خارج سلولی بر اساس منشأ، نحوه ساخته شدن و اندازه تعریف کرده‌اند (۶): ۱) اگزوزوم‌ها ۲) میکرووزیکول‌ها و ۳) اجسام آپوپتوزی. اگزوزوم‌ها منشأ اندوزومی

دارند که از اندوزوم ثانویه به‌صورت وزیکول‌های داخل لومن تشکیل شده و درنهایت با ترکیب اندوزوم ثانویه با غشای پلاسمایی آزاد می‌شوند. این وزیکول‌ها حاوی DNA، mRNA، microRNA و سایر RNA های غیرکد شونده، پروتئین‌های سیتوپلاسمی و غشایی و لیپید هستند و اندازه آن‌ها بین ۳۰-۱۲۰ نانومتر است. میکرووزیکول‌ها (MVs)[1] یا وزیکول‌های ریزشی جمعیت ناهمگنی از EVs هستند که اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰ نانومتر دارند. این وزیکول‌ها به‌صورت جوانه زدن و کنده شدن از سطح غشای سلول‌ها به محیط خارج سلولی آزاد می‌شوند. این مکانیسم تشکیل مشابه مرحله برش در سیتوکینوسیز[2] است (۱۲). علاوه بر این، نحوه تشکیل MV مشابه بیرون زدن ویروس از سلول است. بسیاری از سلول‌ها ازجمله سلول‌های اندوتلیالی، پلاکت‌ها و اریتروسیت‌ها MV آزاد می‌کنند. اعتقاد بر این است که MVs در پاسخ به محرک آزاد می‌شوند ولی اگزوزوم‌ها در حالت پایه و ذاتی نیز آزاد می‌شوند (۶، ۱۲). مشاهدات نشان می‌دهد که این وزیکول‌ها به‌طور فعال به آنکسین V متصل می‌شوند و غشای آن‌ها غنی از فسفاتیدیل سرین است. Larson و همکاران نشان دادند که بعضی از این MVs به آنکسین V متصل نمی‌شوند و بعضی از آن‌ها غنی از فسفولیپید هستند (۱۳). مطالعات نشان می‌دهد که MVs همراه با اگزوزوم‌ها در سیگنالینگ‌های متعدد سلولی نقش دارند و این ذرات از طریق یک سری مکانیسم‌های منظمی مولکول‌های زیستی فراوانی را منتقل می‌کنند. محتویات MVs در پاسخ به محرک‌ها تغییر پیدا می‌کند. برای مثال در شرایط پیش ترومبوز پلاکت‌ها میکرووزیکول‌هایی با اندازه بزرگ‌تر آزاد می‌کنند که حاوی فاکتورهایی برای فعال کردن سلول‌های اندوتلیال هستند. بعد از گسترش ترومبوز، پلاکت‌ها میکرووزیکول‌هایی آزاد می‌کنند که حاوی فاکتورهایی برای حذف ترومبوز است (۱۳، ۱۴). این یافته‌ها نشان می‌دهد که میکرووزیکول‌ها ازنظر اندازه و محتوا ناهمگن بوده و شناسایی و جداسازی جمعیت ویژه‌ای از میکرووزیکول‌ها می‌تواند یک هدف مهم در مطالعه عملکرد و زیست‌شناسی وزیکول‌های خارج سلولی باشد. اجسام آپوپتوزی (ABs)[3] بزرگ‌ترین وزیکول‌های خارج سلولی ازنظر اندازه هستند. این اجسام به‌صورت قطعات و تکه‌های سلولی از سلول‌های در حال آپوپتوز آزاد می‌شوند. پروتئین ROCK-1[4]در تشکیل این اجسام ۱-۵ میکرومتری نقش دارد. مطالعات روی تشکیل ABs نشان می‌دهد که پروتین کاسپاز ۳ موجب فعال شدن پروتئین ROCK-1می‌شود که آن هم به نوبه خود زنجیره سبک میوزین را فسفریله می‌کند و موجب کنده شدن قطعات سلول می‌گردد (۱۵). فسفریله شدن زنجیره سبک میوزین و به‌دنبال آن فعالیت ATPase این زنجیره موجب القای واکنش سیتواسکلتون اکتین-میوزین شده و درنهایت هسته یکنواختی خود را از دست می‌دهد. این عمل در برگشت موجب شکست در کروموزوم‌ها و تکه تکه شدن DNA و بسته بندی شدن این قطعات در اجسام آپوپتوزی می‌شود. این اجسام ممکن است حاوی اندامک‌ها و قطعات DNA و هیستون باشد. ازآنجایی‌که ABs حاوی انواع پروتئین، DNA و miRNA هستند می‌توانند در ارتباطات سلولی و گسترش بیماری نقش داشته باشند. اجسام آپوپتوزی سلول‌های اندوتلیال غنی از سایتوکین IL-α هستند که می‌توانند ترشح کموکاین‌ها تقویت کرده و موجب بروز التهاب گردند. علاوه بر این مشخص شده است که ABs نقش مهمی در فاگوسیتوز از طریق ارائه یک سری سیگنال‌ها دارند بنابراین از القای نکروز جلوگیری می‌کنند (۱۶). مقایسه این وزیکول‌ها در جدول ۱ آمده است(۶، ۱۳).

جدول (۱): مقایسه ویژگی‌های وزیکول‌های خارج سلولی

نوع وزیکول	منشأ	اندازه	مارکر	محتوا	مورفولوژی	روش استخراج
اگزوزوم	از طریق جوانه زدن به سمت داخل غشای MVB /اندوزوم ثانویه	۱۰۰-۳۰ نانومتر	CD9, CD63, CD81, Tsg101, Alix, Hsp60, Hsp70, Hsp90	پروتئین، لیپید mRNA, miRNA, double-stranded DNA	جامی شکل	سانتریفیوژ متوالی با گرادیانت سوکروز و اولتراسانتریفیوژ با دور g۲۰۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰
میکرووزیکول	به‌طور ریزشی از غشای پلاسمایی سلول	۱۰۰۰-۱۰۰ نانومتر	لیپید رفت ها و مولکول‌های TF و flotillin	پروتئین، لیپید miRNA ،mRNA	شکل نامنظم	سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰۰-۱۸۰۰۰ g

1 Microvesicles
2 Cytokinesis
3 Apoptic Body
4 Rho-Associated Kinase-1

اجسام آپوپتوزی	از سلول‌های آپپتوز شده	۱-۵ میکرومتر	بیان PS	پروتئین، اندامک، قطعات DNA و microRNA	شکل نامنظم	سانتریفیوژ با دور g۱۰۰۰-۴۰۰۰

اگزوزوم‌ها:

اولین بار پان، هاردینگ و همکارانش گزارش کردند که رتیکولوسیت‌های پستانداران در زمان تمایزشان نانووزیکول‌هایی ترشح می‌کنند. در ابتدا، تصور می‌شد که ترشح این وزیکول‌ها یک پاسخ جبرانی سلولی برای بیرون انداختن مواد زائد وارد شده مانند گیرنده‌های انتقالی است (۱۷). از آن به بعد اصطلاح "اگزوزوم" به‌طور معمول برای وزیکول‌های چندگانه[1] که به‌صورت وزیکول‌های خارج سلولی ترشح می‌شوند، استفاده شد (۱۸). آزمایشات in vitro نشان می‌دهد که انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران اگزوزوم ترشح می‌کنند (۱۹، ۲۰). اگزوزوم‌ها در فضای داخل سلولی و مایعات زیستی نظیر پلاسما، مایع آمنیوتیک، مایع مفصلی، مایع مغزی نخاعی، ادرار، بزاق، شیر مادر، مایع آلوئولی و حتی صفرا یافت می‌شوند (۲، ۲۱-۲۳). در شرایط عادی یا غیر طبیعی، فعالیت زیستی و کنیتیک اگزوزوم‌ها می‌تواند متفاوت باشد. برای مثال هرگونه تغییر در مقدار کلسیم سیتوزول در ماست سل‌ها در میزان ترشح اگزوزوم در شرایط واکنش حساسیتی شدید، مانند آنچه در رده سلولی K562 انسان دیده می‌شود، مؤثر است (۲۴). همان‌طوری که گفتیم وزیکول‌های ترشحی سلول به سه نوع تقسیم می‌شوند: میکرووزیکول‌ها، اجسام آپوپتوزی واگزوزوم‌ها (۶). میکرووزیکول‌ها و اجسام آپوپتوزی شامل جمعیت ناهمگن شکل از واکوئل‌ها هستند، درحالی‌که اگزوزوم‌ها با مورفولوژِی جامی شکل و یا با اندازه مشخص خود در زیر میکروسکوپ الکترونی دیده می‌شوند (۲۵). شواهد فراوان تأیید کرده است که اگزوزوم‌ها به وسیله تجزیه واکوئل اندوسیتوزی و در داخل جسم چندگانه وزیکولی (MVB[2]) یا اندوزوم جدید که حاوی وزیکول‌های داخلی (ILVs[3]) است، ایجاد می‌گردند (۲۶) (شکل ۲).ILVs از طریق جوانه زدن بخشی از غشای MVBs به درون لومن آن به وجود می‌آیند. MVB تشکیل شده دو سرنوشت اصلی دارد. اول اینکه با لیزوزوم ها ادغام شده و بار خود را تخریب می‌کنند و یا از راه دوم و با ترکیب شدن با غشا سلولی ILVs خود را به محیط خارج سلولی ترشح می‌کنند (۳، ۲۷)(شکل ۲). علاوه بر این، یک راه دیگر در داخل سلول‌های ارائه کننده آنتی ژن مشاهده شده است. در این مسیر آنتی‌ژن‌های مختلف پردازش شده و به سطح بیرونی غشای سلولی منتقل می‌شوند. به‌عنوان مثال، در سلول‌های دندریتی نابالغ، وزیکول‌های داخلی در MVB ها به‌عنوان محل‌های موقت ذخیره مولکول‌های MHC نوع II عمل می‌کنند. پس از فعال سازی سلول، این وزیکول‌ها از طریق بازترکیب با غشا، به سطح غشای پلاسمایی می‌رسند (۲۸). اگزوزوم‌ها با کلسترول، سرامید، انواع فسفوگلیسرید ها و اسفنگولیپیدها، لیپیدها و برخی از مولکول‌های مرتبط با سیگنالینگ مانند پروتئین کینازها، G پروتئین‌ها، Rab پروتئین‌ها، همچنین اکتین، توبولین (Tubulin) و آنکسین (Annexin) بارگیری می‌شوند (۲۹). به رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه جزئیات تشکیل اگزوزوم‌ها، هنوز مکانیسم دقیق شکل‌گیری و بارگیری اگزوزوم‌ها شناخته نشده است و این یک زمینه تحقیق در آزمایش‌های بعدی است (۳۰). بنابراین در داخل سلول MVB ها می‌توانند وارد مسیر ترشحی یا مسیر لیزوزومی شوند. ممکن است جمعیت چندگانه‌ای از MVB ها در یک نوع سلول دیده شود. برای مثال یک گروه از آن‌ها که غنی از ریزدومین های تتراسپانین[4] و لیپیدهای خاص مانند کلسترول، اسفنگومیلین و گانگلیوزید GM3 می‌باشد وحاوی چگالی کم از اسید lysobisphosphatidic و مقاوم به شست و شو است مسیر ترشحی را طی می‌کند و نوع دیگر که حاوی مقدار کمی کلسترول اما مقدار زیاد اسید lysobisphosphatidic است با لیزوزوم ادغام می‌شود (۳۱). مکانیسم تشکیل اگزوزوم در MVB شامل ورود پروتئین‌ها و لیپیدهای معین به غشا اندوزومی و وارد کردن مولکول‌ها به ILVهای اولیه و جداسازی ILVها می‌باشد. نتایج آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که پروتئین‌ها به درون اگزوزوم‌ها به‌وسیله دو مکانیسم وارد می‌شوند؛ مکانیسم اول وابسته به ماشینESCRT[5] است که درسمت سیتوزول غشای MVB واقع شده و پروتئین‌های انتقالی غشا، پروتئین‌های شبکه trans-Golgi و پروتئین‌های سطح سلول را شناسایی می‌کند و در گام بعدی، آن‌ها را یوبی کوئیتینه کرده و به داخل اگزوزوم هدایت می‌کنند (۳۲). مسیر دوم مستقل از ماشین ESCRT است (۳۳). درنهایت، اگزوزوم‌ها به‌عنوان شاتلی برای حمل

1 Multivesicular Bodies
2 Multivesicular Body
3 Intreluminal Vesicles
4 Tetraspanin
5 Endosomal Sorting Complexes Required For Transport

بارهای خاص به سلول‌های هدف عمل می‌کنند. بنابراین، اگزوزوم‌ها بر وقایع طبیعی زیستی و وقایع آسیب شناختی اثر می‌گذارند (۳۴).

مکانیسم وابسته به ESCRT:

نقش ماشین ESCRT در تولید ILV ها در اوایل متن توضیح داده شده است (جدول ۲) (۳۵). بسیاری از آزمایشگاه‌ها مکانیسم‌های مختلف مثل انتخاب بار، جوانه زدن و تخلیه وزیکول‌ها از طریق روش siRNA نشاندار شده و آزمایشات مهار shRNA بررسی کرده‌اند (۳۶، ۳۷). مطالعات نشان می‌دهد که از دیدگاه مولکولی اجزا ESCRT در تشکیل MVBها و ILV ها نقش دارند.ESCRT حاوی حدود ۲۰ پروتئین مختلف است که به چهار مجموعه تقسیم می‌شود. علاوه بر این، VPS4[6]، VTA1[7]و ALIX[8]با این مجموعه‌های پروتئینی همراه هستند (۳۸). هر چهار مجموعه در سیر تکاملی ILVها شرکت دارند. ماشین ESCRT ساختار پیچیده‌ای از ESCRT-0 ، ESCRT-I، ESCRT-II و ESCRT-III و مولکول‌های مختلف دیگر است. هر کدام از ماشین‌ها متشکل از زیرمجموعه‌های مختلف است که در سمت سیتوزول غشای اندوزومی قرار دارند (جدول ۲). واکنش کمپلکس ESCRT-0 با ۳-فسفات فسفاتیدیل اینوزیتول لیپید، که بر روی غشای اندوزومی قرار دارد، ماشین ESCRT را فعال می‌کند و آن را به پروتئین‌های ubiquitlated متصل می‌کند. سپس، ESCRT-0 اجزای ESCRT-I را بکار می‌گیرد و منجر به فراخوان مونومرهای ESCRT-II می‌شود. به هم پیوستن II و ESCRT-I آغاز کننده جوانه زدن به سمت داخل از غشا MVB است. نزدیک محل خم شدن غشای ILVهای در حال تشکیل، ESCRT-II اجزا ESCRT-III را فعال می‌کند. درنهایت با استفاده از آنزیم ATPase، پروتئین ubiquitin و زیر مجموعه‌های ESCRT جدا می‌شوند، اما برخی از اجزا ESCRT و پروتئین‌های جانبی مثل TSG۱۰۱[9]، HRS[10] و ALIX در اگزوزوم‌های باقی می‌مانند (۳۸، ۳۹).

جدول (۲): اجزای ماشین ESCRT

کمپلکس	زیر مجموعه‌ها	عملکرد
ESCRT-0	HRS	دسته‌بندی کردن کالاها به شیوه وابسته به پروتئین ubiquitin
	STAM1	
ESCRT-I	Tsg101	پیوستن به پروتئین ubiquitin و ماشین ESCRT-0و تحریک تشکیل جوانه
	Vps28	
	Vps37	
	Mvb12	
ESCRT-II	Vps36	پیوستن به پروتئین ubiquitin و ماشین ESCRT-I و تحریک تشکیل جوانه
	Vps22	
ESCRT-III	2Vps25	تحریک تقسیم وزیکولی
	Vps20	
	Vps32	
	Vps24	
پروتئین‌های فرعی	Vps2	تجزیه و بازیافت ماشین ESCRT
	Vps20	
	Vps32	

مکانیسم‌های مستقل از ESCRT:

6 Vacuolar protein sorting-associated protein

7vesicle trafficking 1

8 ALG-2-interacting protein X

9 Tumor susceptibility gene 101

10 Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

محققان متعددی نشان داده‌اند که محموله‌های اگزوزوم می‌تواند از طریق مکانیسم مستقل از ESCRT بارگیری شود. برای مثال، استافر و همکارانش نشان دادند که تخریب چهار زیرمجموعه از کمپلکس ESCRT بر میزان تشکیل CD63 های MVE تأثیر نمی‌گذارد (۴۰). مشخص شده است که سلول‌های الیگودندروگلیالی، پروتئین‌های پروتئولیپیدی ترشح می‌کنند که وابسته به عملکرد ESCRT نیست، بلکه وابسته به اسفنگومیلیناز، آنزیمی که سرامید ها را می‌سازد، است. در این سلول‌ها، مهار اسفینگومیلیناز منجر به اختلال در سیر تکامل سرامید و کاهش قابل‌توجهی در ترشح اگزوزوم‌ها می‌شود. سرامید برای ایجاد خمیدگی در غشاء MVBها و برای تولید ILV لازم است (۴۱). برعکس، بعد از مهار فعالیت اسفنگومیلیناز در سلول‌های ملانوم انسان، MVBها بدون نیاز به مکانیسم وابسته به تتراسپانین CD63 بدون وقفه تولید می‌شوند (۴۲). بنابراین، مسیر ترکیبی از اگزوزوم‌ها، مسیر اندولیزوزومال نامیده می‌شود. تشکیل اگزوزوم‌ها به شدت وابسته به سرامید است، چون ساخت، بارگیری و آزاد سازی اگزوزوم‌ها عمدتاً به‌وسیله سرامید های تولید شده درنتیجه فعالیت اسفنگومیلیناز انجام می‌شود (۴۳). همزمان، ادگار و همکاران تأیید کردند که CD63 نقش مهمی در شکل گیری MVB ها در بسیاری از سلول‌ها مانند آنچه در سلول‌های HeLa دیده شد، دارد (۴۴). پیش از این معلوم شده بود که در سلول‌های ملانوسیتی، ورود PMEL (پروتئین ملانوزومی) به ILV ها نیاز به پروتئین ubiquitination و زیرمجموعه‌های ESCRT مانند TSPAN8ندارد. این تتراسپانین می‌تواند هر دو نسخه پروتئین رونوشت و غشایی را از اینتگرال های VCAM-1و α4 درون اگزوزوم‌های ترشحی به‌وسیله سلول‌های آدنوکارسینوما ی پانکراس موش اصلاح کند (۴۴، ۴۵). پروتئین‌های تتراسپین شامل CD9 ، CD63، CD81 و CD82 و پروتئین‌های شوک گرمائی مانند HSP70و HSP90 هستند که در اکتوزوم ها قرار دارند و گاهاً به‌عنوان نشانگرهای این ساختارها استفاده می‌شوند. به دلیل عملکرد احتمالی آن در ارائه آنتی ژن، بسیاری از اگزوزوم‌ها دارای مولکول‌های MHC کلاس I و II هستند. (۴۶). به‌طور مشابه، القاء CD82و CD9 در سلول‌های HEK293 باعث ترشح اگزوزوم حامل β-کاتنین در روش وابسته به سرامید می‌شود (۴۷). بعضی از متخصصین، نقش اساسی سرامید در سیر تکامل اگزوزوم در سلول‌های سرطانی را تأیید کرده‌اند (۴۸). پیشنهاد شده است که سرامید می‌تواند درهم آمیختگی میکرودمین های کوچک به درون دومین‌های بزرگ را القا کند و باعث تحریک جوانه زدن شود (۴۹).

تجمع کلسترول ناشی از جهش ژنتیکی یا دارویی، باعث افزایش انتشار وزیکول‌های حامل فلوتیلین-۲، ALIX، CD63 و کلسترول در سلول‌های الیگودندروگلیا می‌شود که این ویژگی نقش کلیدی مکانیسم وابسته به فلوتیلین-۲ را تأیید می‌کند (۵۰). تحقیقات نشان داد که یکی دیگر از مولکول‌های ضروری در سیر تکاملی اگزوزوم‌ها، فسفولیپاز D2 است، که فسفاتید اسید (PA) را از فسفاتیدیل کولین تولید می‌کند. به نظر می‌رسد که فسفاتید اسید مانند سرامید عمل می‌کند (۵۰). تخریب پروتئولپید پروتئین ۲ با siRNAیاCAY10594 ، ترشح اگزوزوم در رده سلولی MCF-7 را پس از درمان با siRNA یا CAY10594 کم می‌کند درحالی‌که القاء پروتئولیپید پروتئین ۲ در سلول‌های RBL-2H3 نشان‌دهنده افزایش ترشح اگزوزوم از مسیر وابسته به PLP2 است (۵۱).

کنترل انتقال و ترکیب MVB با غشای پلاسمایی:

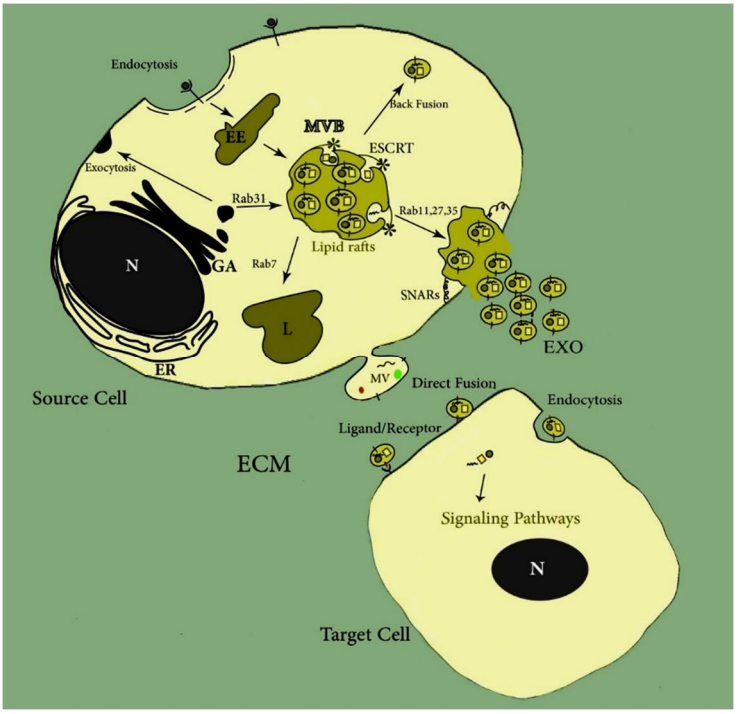
تحقیقات مولکولی در رابطه با انتقال و ترشح اگزوزوم نشان‌دهنده○ نقش قابل‌توجه خانواده پروتئین Rab است (۵۲)(شکل ۲). پروتئین‌های Rab توانایی کنترل جابجایی وزیکول‌ها در مسیرهای اندوسیتوزی و ترشحی با به کار گرفتن افکتورهای پروتئینی خاص بر روی سطح غشا، تحریک اندام یا کوتاه کردن وزیکول در غشاهای هدف از طریق تعامل با اسکلت سلولی یا اتصال به قسمت گیرنده غشا را دارند. بیش از ۶۰ پروتئین Rab در انسان شناسایی شده است که هر کدام ترجیحاً با یک مسیر داخل سلولی همکاری می‌کنند (۵۳). در مرحله نهایی به نظر می‌رسد که پروتئین‌های SNARE[1] ترکیب MVB ها با غشا پلاسمایی را وساطت می‌کنند. SNARE خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که ادغام وزیکول‌ها را تنظیم می‌کنند (۵۴). در فرایند ادغام غشا، SNARE های وزیکولی (v-SNAREs) که در MVB ها مستقر شده‌اند، با SNARE های هدف که در سمت داخل سلولی غشا پلاسمای هستند ارتباط برقرار می‌کنند و یک کمپلکس SNAREرا تشکیل دهند (۵۵) (شکل ۲). حضور پروتئین‌های SNAREمانند SNAP-23 ، VAMP-7 و VAMP-8 در ترکیب کنترل شده با Ca^{2+} از لیزوزوم های ترشحی با PM در انواع سلول‌های مختلف گزارش شده است (۵۶). با این حال، نقش کلیدی پروتئین‌های SNARE در آزاد شدن اگزوزووم‌ها خیلی کم مورد مطالعه قرار گرفته است. . Fader و همکاران نشان دادند که VAMP-7به‌عنوان یک v-SNARE در ترکیب MVB ها با غشای پلاسمایی در آزاد کردن وزیکول‌های خارج سلولی حامل استیل کولین استراز در رده سلولی K562 نقش دارد (۵۷). به نظر می‌رسد که SNARE های مختلفی در فرایند ادغام غشای MVB با غشای

1 Soluble NSF Attachment Protein Receptor

پلاسمایی درگیراند و هنوز مشخص نیست که آیا پروتئین‌های SNARE یکسان در سلول‌های مختلف با MVB های مختلف درگیر اند یا نه .

روش‌های جذب وزیکول‌های خارج سلولی:

بعد از اینکه وزیکول‌های خارج سلولی به محیط خارج سلولی آزاد شدند توسط یک سری مکانیسم‌هایی به سلول‌های هدف می‌رسند و محتویات خود را آزاد می‌کنند. به دلیل ناهمگونی در وزیکول‌های خارج سلولی و نوع سلول‌های هدف، دانشمندان ۳ روش جذب برای آن‌ها در نظر گرفته‌اند(شکل ۲) ۱) مسیر داخل شدن ۲) مسیر واکنش رسپتور-لیگاند ۳) مسیر ادغام مستقیم (۲۴). در مسیر داخل شدن سلول‌های هدف وزیکول‌های خارج سلولی را از طریق مسیرهای اندوسیتوزی مثل اندوسیتوز وابسته به کلاترین، کاولین[۲]، ماکروپینوسیتوز[۳]، فاگوسیتوز و خم شدگی لیپید رفت‌ها دریافت می‌کنند. در مسیر واکنش رسپتور-لیگاند وزیکول‌های خارج سلولی بدون وارد شدن به داخل سلول از طریق مولکول‌های سطحی با مولکول‌های سطحی غشای سلول هدف واکنش می‌دهند. برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از سلول‌های دندریتی در سطح خود مولکول ICAM-1 دارند که به مولکول LFA1-R در غشای سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن متصل می‌شود و سیگنالینگ سلولی را آغاز می‌کند(۲۷) و یا لنفوسیت‌های T را فعال می‌کند (۲۷، ۲۸). درنهایت در مسیر ادغام مستقیم لایه‌های فسفولیپیدی غشاهای سلول و وزیکول‌های خارج سلولی باهم ادغام می‌شوند و وزیکول‌ها محتویات خود را به سیتوپلاسم سلول آزاد می‌کنند. این مسیر مشابه ادغام غشاها است و پروتئین‌های مختلفی مثل Rab-GTPase و SNARs نقش دارند (۲۶، ۵۸). بنابراین شناسایی روش‌های جذب EVs می‌تواند در طراحی سیستم‌های دارورسانی کمک کننده باشد.



شکل (۲): نحوه تشکیل، ترشح و جذب اگزوزوم. اگزوزم‌ها از طریق جوانه زدن به سمت داخل MVB تشکیل می‌شوند. اگزوزوم‌ها از طریق هر دو مسیر وابسته به ESCRT و غیر وابسته به ESCRT ساخته می‌شوند. محتویات اگزوزم‌ها از مسیر اندوسیتوز، دستگاه گلژی و محصولات داخل سیتوپلاسم تأمین می‌شود. Rab پروتئین‌ها انتقال داخل سلولی MVB و عاقبت آن را میانجگری می‌کنند. MVB براساس ترکیبات غشای خود و یا یه سری مکانیسم‌های ناشناخته می‌تواند مسیر ترشحی، لیزوزومی و ادغام مستقیم را انتخاب کند. اگزوزم‌ها بعد از ترشح می‌توانند از طریق ۳ مسیر ۱) اندوسیتوز ۲) لیگاند-رسپتور و ۳) ادغام مستقیم به سلول هدف برسند. بعد از رسیدن اگزوزم‌ها به سلول هدف موجب تغییرات در عملکرد، رشد، سرنوشت، مورفولوژی می‌شوند. MVs به‌صورت جوانه زدن و ریزشی از غشای سلول‌ها آزاد می‌شوند.

2 Caveolin

3 Macropinocytosis

ECM: Extracellular Matrix; EE: Early Endosome; ER: Endoplasmic Reticulum; EXO: Exosome; GA: Golgi Apparatus; L: Lysosome; MV: Microvesicle; MVB: Multivesicular Body; N: Nucleus

اگزوزوم‌هاو اهداف درمانی:

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که سلول درمانی یا پیوند سلول بنیادی منجر به بروز اثرات مفید در محل پیوند می‌شود. این اکتشافات راهی را برای کاربرد سلول‌های بنیادی در پزشکی گشوده و در چند دهه گذشته پیشرفت کرده است (۵۹). یکی از آشناترین و رایج‌ترین کاربرد سلول‌های بنیادی در زمینه سلول درمانی، پیوند سلول‌های بنیادی خون ساز[1] به مغز استخوان است. سلول‌های بنیادی خون ساز از بخش ستیغ ایلیاک استخوان لگن و نیز از گردش خون قابل استخراج هستند. این سلول‌ها قابلیت خودنوزایی و تقسیم و تمایز به سایر رده‌های سلول‌های خونی را دارند. در این زمینه سالانه حدود ۲۵۰۰ مورد پیوند سلول‌های بنیادی خون ساز برای درمان بیماری‌هایی مثل لنفوما، لوکمیا، بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، نقص‌های متابولیکی مادرزادی[2]، هموگلوبینوپاتی[3] و سندروم بیش تکثیری مغز استخوان[4] در دنیا به‌صورت اتولوگ و آلوژنیک انجام می‌گیرد (۶۰).

علاوه بر این، استفاده از سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی/ پیشساز مزانشیم، سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان و سلول‌های بنیادی قلبی برای پیوند در اندام‌های مختلف ازجمله سیستم قلبی عروقی انجام شده است (۶۱-۶۳). برای مثال Orlic و تیم تحقیقاتی‌اش نشان دادند که وقتی سلول‌های بنیادی مغز استخوان $c\text{-}kit^{+}$ را به‌طور آلوژنیک به داخل بافت قلب موش‌های دچار انفارکتوس تزریق شوند، موجب بازسازی ماهیچه قلب و بهبودی عملکرد قلب می‌شوند (۶۴). بعدازآن محققان اثرات مفید سلول درمانی را در مطالعات بالینی در بیماران دچار بیماری‌های قلبی عروقی نشان دادند(۶۵، ۶۶). در زمینه درمان بیماری‌های عصبی با سلول‌های بنیادی مطالعات زیادی به‌صورت آزمایشگاهی و بالینی انجام گرفته است. در این مطالعات از سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیم و سلول‌های بنیادی چندتوان القایی برای درمان بیماری‌هایی مثل پارکینسون، هانگینتون و آلزایمر استفاده شده است (۶۷). با این حال برخی مشکلات مثل ملاحظات اخلاقی، ایمنی زایی، خطر تومورزایی، و تشکیل سلول‌های ناخواسته در این زمینه وجود دارد (۶۸). سلول‌های بنیادی مزانشیم (MSCs) [5] یک نوع دیگر از سلول‌های بنیادی هستند که اثرات درمانی آن‌ها در مطالعات سلول درمانی بررسی شده است. برای مثال پیوند MSCs موجب بهبودی و بازسازی استخوان در مدل‌های حیوانی می‌شود (۶۹). علاوه برمدل های حیوانی، اثرات درمانی این سلول‌ها در درمان بیماری استئوژنسیز ایمپرفکتا[6] در کودکان به اثبات رسیده است (۵). بنابراین MSCs نقش بسیار مهمی درترمیم و بازسازی بیماری‌ها و ضایعات استخوان دارند (۷۰). علاوه بر این، در مدل‌های حیوانی انفارکتوس قلب و ضایعه مغزی مشخص شده است که این سلول‌ها به محل زخم مهاجرت کرده و بازسازی بافت را انجام می‌دهند (۷۱، ۷۲). با این حال، بررسی نشان می‌دهد که زمانی که این سلول‌ها تزریق شوند، تعدادی کمی از آن‌ها به محل هدف می‌رسند و بیشتر آن‌ها در مویرگ‌های شش به دام می‌افتند (۷۳) و همچنین اثرات درمانی این سلول‌ها کوتاه مدت است (۷۴، ۷۵) مشاهدات نشان می‌دهد که مکانیسم‌هایی به‌غیراز تمایز و جایگزینی مستقیم سلول‌های بنیادی تزریق‌شده به بافت‌های آسیب‌دیده، نقش اساسی درترمیم اندام ایفا نماید (۷۶)، که این مکانیسم‌های جایگزین اغلب تحت عنوان اثرات پاراکرین شناخته می‌شود و عامل اثرات مثبت سلول درمانی درنظر گرفته می‌شوند (۷۷). این دیدگاه کاملاً با این حقیقت سازگاری دارد که سلول‌های زنده در اندام‌ها از طریق مکانیسم‌های سلول- سلول و سلول- ماتریکس خارج سلولی و همچنین با مولکول‌های شیمیایی خارج سلولی که سلول ترشح می‌کند ارتباط برقرار می‌کنند (۷۸). این عوامل آزادشده ممکن است بر موارد زیر تأثیر بگذارد: الف- بر همان سلولی که مولکول را تولید کرده است(سیگنال‌دهی اتوکرین)، ب- بر سلول‌های هدف در فاصله نزدیک (سیگنال‌دهی پاراکراین) یا ج- بر سلول‌های هدف در فاصله دور (سیگنال‌دهی اندوکراین) (۷۸، ۷۹).

شواهد روزافزون نشان می‌دهد که اثرات پاراکراین در حقیقت نقش عمده‌ای در سلول درمانی در زمینه پزشکی بازساختی ایفا می‌کند که در آن سلول‌های بنیادی و یا سلول‌های پیشساز متمایزتر برای ترمیم اندام‌های آسیب دیده ازجمله قلب، کلیه یا بافت‌های عصبی استفاده می‌شود (۷۶). سلول‌های بنیادی سیتوکین‌ها، کموکین‌ها، فاکتورهای رشد بسیار و سایر مولکول‌های کوچک زیست-فعال که فعالیت و عملکرد سلول‌ها را به روش اتوکراین و پاراکراین تنظیم می‌کند را ترشح می‌کنند (۷۹). در این راستا، سلول‌ها علاوه بر تولید سیتوکین‌های مختلف، انواع بیومولکول‌های

1 Hematopoietic Stem Cell
2 Congenital Metabolic Defects
3 Hemoglobinopathies
4 Myeloproliferative Syndromes
5 Mesenchymal Stem Cells
6 Osteogenesis Imperfecta

زیستی را در قالب وزیکول‌های اگزوزومی برای برقراری ارتباط با سایر سلول‌ها و همچنین اثر بر فرایندهای زیستی به فضای خارج سلولی ترشح می‌کنند. همان طوری که اشاره شد اگزوزوم‌هاحاوی انواع مختلف پروتئین، اسیدهای نوکلئیک و چربی هستند و می‌توانند در سراسر بدن انتشار یابند (۸۰). علاوه بر این، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که اگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی مزانشیم اثرات مفیدی در درمان بیماری‌های مختلف دارند و به‌جای سلول درمانی می‌توان از اگزوزوم درمانی استفاده کرد(۸۱). این ویژگی‌های اگزوزوم توجه محققین در زمینه نانوتکنولوژی پزشکی را به خود جلب کرده است و دانشمندان را به استفاده از اگزوزوم درمانی به جای سلول درمانی ترغیب کرده است (۸۲). به‌طورکلی مطالعات در زمینه کاربرد اگزوزوم‌ها بیشتر به کاربرد اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی و به‌عنوان حامل عوامل درمانی در پیش‌بینی و درمان بیماری‌های مختلف مثل انواع سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های کلیوی، بیماری‌های کبد و متابولیکی، بیماری‌های شش، ناهنجاری‌های سیستم ایمنی، بیماری‌های‌استخوان و بیماری‌های عصبی متمرکز شده است. باید توجه داشت که بیشتر مطالعات کاربرد درمانی اگزوزوم‌ها در مراحل اولیه و پاراکلینیکی است و این مطالعات در مدل‌های حیوانی و in vitro در حال بررسی است (۹، ۸۳).. جدول ۳ کاربرد اگزوزوم‌ها را به‌صورت طبقه بندی شده نشان می‌دهد.

جدول (۳): طبقه بندی کاربردهای اگزوزوم‌ها

کاربرد اگزوزوم‌ها	مدل‌های بیماری	منبع
نشانگرزیستی	انواع بیماری‌های سرطان و غیر سرطان	(۸۳، ۸۴)
حامل عوامل دارویی	سرطان سروگردن، سرطان پستان، سرطان کبد، سرطان گلایوبلاستوما، بیماری آلزایمر، نارسایی قلب و بیماری التهاب	(۹)
اگزوزوم درمانی	انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های زخم، بیماری‌های استخوان، بیماری‌های کلیوی، بیماری‌های متابولیکی، بیماری‌های عصبی	(۸۵)

دانش کاربرد درمانی و بالینی اگزوزوم‌ها در حال افزایش است و شامل استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی بیماری‌های مختلف می‌باشد. همچنین اگزوزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل عوامل درمانی در درمان بیماری‌ها در کارآزمایی های بالینی به کار روند. در این راستا، با جستجوی کلمه کلیدی اگزوزوم در پایگاه کارآزمایی‌های بالینی (https: //clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=exosome &cntry=&state=&city=&dist=) تا ماه April سال ۲۰۱۹ تعداد ۹۹ مطالعه در رابطه با اگزوزوم‌ها ثبت شده است. از میان مطالعات ثبت شده بیشترین تعداد(۵۲ مطالعه) در رابطه با مطالعات پایه‌ای در زمینه زیست‌شناسی اگزوزوم‌ها است و کم‌ترین آن‌ها (به تعداد ۳) در زمینه استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان حامل دارو ثبت شده است. نتایج آنالیز و طبقه بندی مطالعات درمانی بالینی وابسته به اگزوزوم در جدول ۴ آورده شده است. در ادامه این بخش ما به نقش کاربردی اگزوزوم‌هادر زمینه ۱- نشانگر زیستی و ۲- حامل عوامل درمانی می‌پردازیم.

جدول (۴): کاربردهای بالینی اگزوزوم‌ها

کاربرد اگزوزوم‌ها	تعداد	تعداد برحسب درصد	بیماری‌ها
مطالعات پایه‌ای	۵۱	۵۱/۵۱	بیشتر سرطان
نشانگر زیستی	۳۸	۳۸/۳۸	بیشتر سرطان
درمانی	۷	۷/۰۷	سکته مغزی، زخم، سندرم تخمدان پلی کیستیک، عفونت، دیابت نوع ۱، بیماری شکستگی ماکولای شبکیه، سرطان سروگردن
حامل عوامل دارویی	۳	۳/۰۳	سرطان

اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی:

تمام مولکول‌های موجود در اگزوزوم‌ها می‌توانند به‌طور بالقوه برای تشخیص بیماری استفاده شوند. اگزوزوم‌ها منابع غنی از

نشانگرهای زیستی بالقوه را حمل می‌کنند، ترشح اگزوزوم‌ها به فضای خارج سلولی فرصت مناسبی برای بررسی در مایعات بدن مانند خون، ادرار و آسیست بدخیم را فراهم می‌آورد (۶). اگزوزوم‌ها به‌طور گسترده‌ای در بیماران سرطان ریوی و ملانوما حضور دارند (۸۶). نقش دوگانه اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگرزیستی و پیام‌رسان فرصت‌هایی به‌دست آورده که تا محققین حالت زمانی- مکانی سلولی را اندازه بگیرند و نگاه دقیق‌تری به نقش اگزوزوم‌ها در پزشکی بپردازند (۱۷).جداسازی اگزوزوم‌ها و شناسایی محتویات آن‌ها موجب شده است که از اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگرزیستی برای شرایط پاتولوژیکی یا شدت یا مرحله یک بیماری استفاده کرد. اگزوزوم‌ها به‌طور گسترده در بیماری‌های سرطان به‌عنوان نشانگرزیستی استفاده می‌شوند (جدول ۳و ۴). این مطالعات محدود به سرطان نبوده و مطالعات مشابهی در رابطه با پروتئوم اگزوزوم‌های سایر سلول‌ها و مایعات زیستی انجام شده است. بررسی و درک نقش اگزوزوم‌های سیستم قلب و عروق در فیزیولوژی قلب وعروق منجر به کشف نشانگرزیستی اگزوزومی در بیماری‌های قلبی وعروقی شده است (۸۷). مثال دیگر از بیماری‌های غیر سرطانی می‌توان به بیماری آسم اشاره کرد. بررسی اگزوزوم‌های جدا شده از این بیماران الگوی بیان متفاوت در محتویات miRNAها نشان داد. پروفایل بیانی کل ۲۴ miRNA تغییر یافته بود به‌طوری که از بین آن‌ها اعضای خانواده let-7 وmiRNA-200 نسبت به نمونه‌ای سالم بطور خیلی معنی‌داری کاهش بیان داشتند. محققین اظهار داشتند که این الگو می‌تواند به‌عنوان نشانگرزیستی به کار برده شود (۸۸). بنابراین کاهش یا افزایش محتویات اگزوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان نشانگرزیستی در شرایط پاتولوژیکی در نظر گرفته شود. در زمینه بیماری‌های سرطان، miRNA-18a که عضو انکوژن از شاخه miR-17-92 است و با اگزوزوم‌ها منتقل می‌شود و مشخص شده است که مقدار این مولکول در افراد سرطانی بیشتر از افراد سالم است (۸۹). miRNA-145 اگزوزومی که سرکوب‌گر تومور است، سطح بیان آن در سرطان بدخیم تیروئید کم است (۹۰). علاوه‌بر این، الگوی بیان miRNA اگزوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان نشانگرزیستی برای تشخیص زودهنگام سرطان‌های مختلف به کار رود برای مثال در زمینه سرطان پستان که یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها است، محققین پیشنهاد کرده‌اند که بیان miRNAهای اگزوزومی مثل miR-373, miR-182, miR-21, miR-10 و miR-1246 می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی در مراحل اولیه پیشرفت سرطان به کار برده شوند (۹۱)

محتویات اگزوزوم‌ها منحصراً miRNA نبوده و پروتئین‌های‌مختلفی دارند که نشان‌دهنده شرایط سلول است. فاکتورهای رونویسی که در EVهای ادرار افراد بیمار دچار زخم حاد کلیوی (AKI) به‌عنوان نشانگرزیستی این بیماری شناخته شده‌اند (۹۲). پروتئین‌های مختلف اگزوزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان عامل تشخیص اولیه تومورها مورد استفاده قرار گیرند (۹۳). در یک مطالعه، آنالیز پروتئومیک اگزوزوم‌های ادراری منجر به شناسایی هشت نشانگر زیستی پروتئینی برای غربالگری و کنترل سرطان‌های مثانه- صفراوی شد (۹۴). Jakabsen و همکاران با آنالیز پروتئینی اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های سرطانی شش پیشنهاد کردند که پروتئین‌های سطحی اگزوزوم مثل CD317 و EGFR می‌توانند به‌عنوان بیومارکر این سرطان در نظرگرفته شوند (۹۵). همچنین پروتئین‌هایی مثل Survivin, Survivin-2B, CEA و Tumor antigen15- هم به‌عنوان نشانگرزیستی در سرطان پستان معرفی شده‌اند (۹۶). بنابراین، این حقیقت که پروفایل miRNAها و پروتئین‌های اگزوزومی نشان‌دهنده پروفایل بافت منشاشان هستند می‌تواند به‌عنوان بیومارکر تشخیصی برای بیماری‌های سرطان و غیرسرطان بدون استفاده از نمونه بافت سرطانی باشد.

اگزوزوم‌ها به‌عنوان وزیکول‌های منتقل کننده دارو:

اگزوزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل دارو یا عوامل زیستی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند (جدول ۳و۴). Shetam و همکارانش پیشنهاد کردند که ترکیب اگزوزوم و siRNA یک ابزار مفید برای دست کاری ژن هدف در جمعیت ناهمگنی از سلول‌ها است. بنابراین، استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان شاتل الیگو نوکلئوتید در محیط‌های مختلف باید دقیقاً مورد توجه قرار گیرد (۹۷). اگزوزوم‌ها به سرعت در سرتاسر مایعات زیستی بدن مانند خون، ادرار، مایع برونشیول و غیره پخش می‌شوند (۹۸). آن‌ها می‌توانند از طریق گیرنده‌ها و غشاهای پلاسمایی به داخل سلول‌های هدف وارد شوند و محموله خود را به درون سیتوپلاسم سلول‌های هدف تحویل دهند و موجب القای پاسخ‌های سلولی شوند.

برای مثال، اگزوزوم‌های سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن (سلول‌های دندریت) می‌توانند پاسخ ایمنی سلولی را با انتقال مولکول‌های MHC کلاس I و کمپلکس II به سلول‌های T و سلول‌های ایمنی تعدیل کنند (۹۷، ۹۹). در سال‌های اخیر، مطالعات مختلف نشان داده است که تحویل دارو با استفاده از اگزوزوم برای بیماری‌های مختلف مفید است. با استفاده از اگزوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین[1] یا نانو وزیکول‌های وابسته به اگزوزوم، رشد سلول‌های سرطانی کولون و پستان با موفقیت مهار شدند (۱۰۰،

1 Doxorubicin

۱۰۱). در سال‌های اخیر، مطالعات مختلف نشان داده است که تحویل دارو از طریق اگزوزوم برای بیماری‌های مختلف مفید است. با استفاده از اگزوزوم‌های مملوء از دوکسوروبیسین یا نانووزیکول‌های شبه اگزوزوم، رشد سلول‌های سرطانی کولون و پستان با موفقیت مهار شده‌اند(۱۰۰، ۱۰۲). براساس نوع سلول، اگزوزوم‌ها دارای ویژگی‌ها و قابلیت‌های منحصربه‌فرد هستند. به‌عنوان مثال، اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول سرطانی می‌توانند به‌طور مستقیم پاکلی تاکسل (PTX)[۲] را به سلول‌های اولیه سرطان پروستات برسانند و سلول‌های مادری تومور را حساس کنند (۱۰۳). مزایای اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی به‌طور فزاینده‌ای در حال گزارش است. سلول‌های بنیادی مزانشیم مهندسی شده با PTX می‌توانند به‌طور مؤثری اگزوزوم‌های غنی از PTX را تحویل داده و منجر به مهار رشد سلول تومور در محیط آزمایشگاه شوند (۱۰۴). بارگذاری اگزوزم‌ها با ترکیبات ضد سرطان، نتایج امید بخشی را به‌دست آورده است. در یک آزمایش، دوکسوروبیسین و PTX به‌طور همزمان در اگزوزوم‌ها بارگذاری شدند و به سلول‌های سرطانی زنوگرافت درون مغز Zebra ماهی تزریق شدند. یافته‌ها نشان داد که رشد تومور کاهش یافت (۱۰۵). علاوه بر توالی‌های فاماکولوژیک و نوکئوتیدی خاص، برخی از محققان از اسانس‌های گیاهی برای بارگذاری استفاده کردند. اگزوزوم‌های حاوی کورکومین موجب کند شدن التهاب مغزی ناشی از لیپو پلی ساکارید در موش شدند (۱۰۶، ۱۰۷). اگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی جنینی موشِ از قبل بارگیری شده با کورکومین[۳] وقتی با عروق عصبی کشت شوند موجب بروز پاسخ‌های رگ‌سازی و بازسازی به دنبال آسیب ایسکمی-رپرفوژیون در مدل موش می‌شوند (۱۰۸). تنظیم رونویسی و کنترل بیان ژن از دیگر مزایای اگزوزوم‌ها می‌باشد. لوناوات و همکاران نشان دادند که اگزوزوم‌های بارگذاری شده با siRNAها موجب کنترل بیان ژن در محیط آزمایشگاهی می‌شوند (۱۰۹). براساس نوع سلول، اگزوزوم‌ها دارای ویژگی‌ها و قابلیت‌های منحصربه‌فرد هستند. به‌عنوان مثال، اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول سرطانی می‌تواند به‌طور مستقیم داروی ضد سرطان PTX را به سلول‌های مرکزی اولیه سرطان پروستات برساند و سلول‌های مادری تومور را به سمیت حساس کنند (۱۰۳). Kim و همکارانش نشان دادند که اگزوزوم‌های غنی از PTX موجب افزایش سرکوب تومور و کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی در مدل موش سرطان ریه می‌شود (۱۱۰). این نتایج نشان می‌دهد که اگزوزوم‌ها می‌توانند کاندید مهم برای حمل عوامل دارویی مورد استفاده قرار بگیرند.

مزایای اگزوزوم‌ها در مقایسه با وزیکول‌های دیگر در انتقال عوامل درمانی:

اگزوزوم‌ها شباهت زیادی با وزیکول‌های انتقالی دارند و دارای یک غشای لیپیدی-زیستی هستند که هسته آبی را پوشش می‌دهد (۱۱۱). همچنین حاوی هر دو مواد هیدروفیلی و لیپوفیلی هستند و محموله‌های خود را به اهداف مورد نظر می‌رسانند (۳۴). این ویژگی‌ها اگزوزوم‌ها را قادر می‌سازد که نسبت به برخی از محدودیت‌های لیپوزوم ها فائق آیند(۱۱۲). اگزوزوم‌ها به راحتی می‌توانند در مایعات بدن پخش شوند و برای مدت طولانی در گردش خون باقی بمانند و از سدهای فیزیولوژیکی عبور کرده و داخل سلول شوند (۸۲). اگزوزوم‌هایی که حاوی حجم زیادی از مولکول‌های زیستی هستند، پاسخ‌های ایمنی زا را تحریک نکرده و به جای بافت‌های هدف در کبد یا ریه انباشته نمی‌شوند (۱۱۳).

مدل‌های تجویز اگزوزوم:

براساس نوع بیماری، اگزوزوم‌ها با روش‌های مختلفی تجویز می‌شوند. دسترسی آسان به مقادیر زیادی از اگزوزوم‌ها باید در طراحی آزمایش‌های بالینی سنجیده شود. مسیرهای تجویز باید به درستی انتخاب شوند به‌خصوص این‌که برای دستیابی به مزایای درمانی مؤثر در تومورهای پنهان این روش‌ها باید بهینه شده باشند (۱۱۴). در بعضی از آزمایش‌ها، راه‌های مختلف برای افزایش راندمان تحویل دارو برای یک بیماری خاص مورد استفاده قرار گرفته است. در یک آزمایش، هر دو روش تزریق داخل وریدی و داخل بینی در بیماری پارکینسون مدل موش استفاده شد (۱۱۰). در جدول شماره ۵ روش‌های استفاده شده در مطالعات تجویز اگزوزوم‌ها همراه با مقایسه معایب ومزایای آن‌ها آورده شده است.

جدول (۵): مدل‌های تجویز اگزوزوم

روش‌های تجویز اگزوزوم	نوع بیماری	محتویات اگزوزوم	ویژگی روش	معایب
تزریق داخل وریدی	مدل سرطان (۱۰۰)	دوکسوروبسین	آسان	ولی میزان بالایی از اگزوزوم و به دام افتادن در اندام‌های دیگر بدن
	مدل بیماری پارکینسون (۱۱۰)	آنزیم کاتالاز		
	مدل موش سالم (۱۱۵)	لوسیفراز		

2 Paclitaxel

3 Curcumin

روش‌های تجویز اگزوزوم	نوع بیماری	محتویات اگزوزوم	ویژگی روش	معایب
	مدل موش ترانس‌ژن (۱۱۶)	siRNA		
	مدل رت سالم (۱۱۷)	گیرنده آلفا فولات		
تزریق مستقیم به بافت	سرطان (۱۱۸)	علامت فلوئورسنت	کارآمد	تهاجمی
تزریق داخل صفاقی	مدل بیماری عفونت خون (۱۰۷)	کورکومین	آسان	انتشار در گستره○ صفاق
تزریق داخل بینی	مدل بیماری پارکینسون (۱۱۰)	کورکومین	آسان	راندمان پایین
تجویز دهانی	مدل نارسایی قلب (۱۱۸)	علامت فلوئورکروم	آسان	حذف توسط سیستم گوارش

بحث و نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های پیچیده و مولکول‌های زیستی متعددی در ساخته شدن و بارگیری اگزوزم‌ها درگیر هستند. پس از سپری شدن سه دهه از معرفی اگزوزوم‌ها، پیشرفت‌های زیادی در تعیین زیست‌شناسی و عملکرد آن‌ها انجام شده است. با کشف اگزوزوم‌ها راه امید بخشی برای درمان بیماری‌های مختلف به وجود آمداست. در حقیقت، اگزوزوم‌ها مولکول‌های زیستی را منتقل می‌کنند بنابراین می‌توان با دستکاری محموله‌های زیستی از آن‌ها به‌عنوان عامل درمانی در بهبودی بیماری‌های مختلف استفاده کرد. علاوه بر این می‌توان با بارگذاری داروها به اگزوزم‌ها به‌طور هدفمند سلول‌های سرطانی را از بین برد. یکی دیگر از کاربرد اگزوزم‌ها استفاده از آن‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی است. این نانوذرات اطلاعات مربوط به سلول‌های مادر را حمل می‌کنند بنابراین با آنالیز اگزوزم‌ها در نمونه‌های زیستی می‌توانیم از وضعیت بیماری مطلع شویم و از این ویژگی برای پیش‌بینی بیماری‌ها استفاده کنیم. استفاده بهینه از اگزوزوم‌ها در اهداف درمانی بالینی، مستلزم دانش و دید قوی و گسترده در مورد واکنش‌های آبشارهای سیگنالینگ مولکولی و در مورد پروفایل حمل شده با اگزوزوم است و اختصاصیت و حساسیت روش‌های استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان نشانگرزیستی و حامل دارو در بخش بالین هنوز به اثبات نرسیده است و لازم است اثرات سوی اگزوزوم‌ها در بخش درمان در مطالعات دیگر موردبررسی قرار گیرد. علیرغم پیشرفت‌های بزرگ در این زمینه، هنوز تعدادی سؤال بدون پاسخ وجود دارد که می‌تواند جزو موضوعات مورد تحقیق آینده قرار گیرد. اول این‌که تکنیک‌های مناسب و ایمن برای تولید مقدار زیادی اگزوزوم در جهت استفاده در درمان چیست؟دوم این‌که کدام نوع سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های اهدا کننده اگزوزوم برای اهداف درمانی مناسب هستند؟ و سوم این‌که ایمنی اگزوزم‌ها در مطالعات انسانی در چه حدی است؟

References:

1. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. Cell Signal 2005;17(10): 1183-93.
2. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc Natl Acad Sci 2004;101(36): 13368-73.
3. Ludwig A-K, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. Int J Biochem Cell Biol 2012;44(1): 11-5.
4. Valadi H, Ekström K, Bossios A ،Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 2007;9(6): 654.
5. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, et al. Alzheimer's disease β-amyloid peptides are released in association with exosomes. Proc Natl Acad Sci 2006;103(30): 11172-7.
6. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. Curr Opin Cell Biol 2014;29: 116-25.
7. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. Cancer Res 2006;66(9): 4795-801.
8. Lai RC, Yeo RWY, Tan KH, Lim SK. Exosomes for drug delivery—a novel

application for the mesenchymal stem cell. Biotechnol Adv 2013;31(5): 543-51.

9. van den Boorn JG, Daßler J, Coch C, Schlee M, Hartmann G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. Adv Drug Deliv Rev 2013;65(3): 331-5.
10. Lässer C. Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors. Expert Opin Biol Ther 2012;12(sup1): S189-S97.
11. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. Kidney Int 78(9): 838-848. 12.
12. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 2013;200(4): 373-83.
13. Lässer C, Théry C, Buzás EI, Mathivanan S, Zhao W, Gho YS, et al. The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles. J Extracell Vesiceles; eCollection 2016.
14. Crescitelli R, Lässer C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. J Extracell Vesicles 2013;2(1): 20677.
15. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. Lab Invest 2003;83(5): 655.
16. Sluijter JP, Verhage V, Deddens JC, van den Akker F, Doevendans PA. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. Cardiovasc Res. 2014;102(2): 302-311.
17. Johnstone RM, Adam M, Hammond J, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J Biol Chem 1987;262(19): 9412-20.
18. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. Proteomics. 2009;9(21): 4997-5000.
19. Simons M, Raposo G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol 2009;21(4): 575-81.
20. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. Int Immunol 2005;17(7): 879-87.
21. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. Lancet 2002.360(9329): 295-305.
22. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. J Transl Med.2011;9(1): 9.
23. Théry C, Ostrowski M, Segura E .Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol 2009;9(8): 581.
24. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. J Proteome Res 2008;7(12): 5157-66.
25. Chaput N, Théry C, editors. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. Semin Immunol; Springer; 2011.
26. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion

to biological function. Immunol Lett 2006;107(2): 102-8.

27. Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. J Cell Biol 2001;155(1): 53-64.
28. Johnstone RM. Exosomes biological significance: a concise review. Blood Cells Mol Dis 2006;36(2): 315-21.
29. Möbius W, Ohno-Iwashita Y, Donselaar EGv, Oorschot VM, Shimada Y, Fujimoto T, et al. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. J Histochem Cytochem 2002;50(1): 43-55.
30. White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter CE. EGF stimulates annexin 1dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. The EMBO Journal 2006;25(1): 1-12.
31. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11(8): 556.
32. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. Traffic 2009;10(7): 925-37.
33. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. BBA – Biomembranes 2012;1820(7): 940-8.
34. Henne WM, Stenmark H, Emr SD. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. Csh Perspect Biol 2013;5(9): a016766.
35. Abrami L, Brandi L, Moayeri M, Brown MJ, Krantz BA, Leppla SH, et al. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. Cell Rep 2013;5(4): 986-96.
36. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. Nat Cell Biol 2012;14(7): 677.
37. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5(4): 317.
38. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. Dev Cell 2011. 20(1): 131-9.
39. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 2012;28: 337-62.
40. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. Science 2008;319(5867): 1244-7.
41. Van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis. Dev Cell 2011;21(4): 708-21.
42. Butler JS. The yin and yang of the exosome. Trends Cell Biol 2002;12(2): 90-6.
43. Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs-and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles .Traffic 2014;15(2): 197-211.
44. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced

endothelial cell activation. Cancer Res 2010: 0008-5472 .CAN-09-2470.

45. Lorentzen E, Conti E. The exosome and the proteasome: nano-compartments for degradation. Cell 2006;125(4): 651-4.
46. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. J Cell Biol 2010;190(6): 1079-91.
47. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Décembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. Cell Host Microbe 2012;12(4): 558-70.
48. Stoorvogel W. Resolving sorting mechanisms into exosomes. Cell Res 2015;25(5): 531.
49. Strauss K, Goebel C, Runz H, Möbius W, Weiss S, Feussner I, et al. Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. J Biol Chem 2010: jbc. M110. 134775.
50. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. Nat Commun 2014;5: 3477.
51. Tanaka N, Kyuuma M, Sugamura K. Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. Cancer Sci 2008;99(7): 1293-303.
52. Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. Physiol Rev 2011;91(1): 119-49.
53. Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. Biochim Biophys Acta 2009;1793(12): 1901-16.
54. Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. Proc Natl Acad Sci 2008;105(7): 2580-5.
55. Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. J Biol Chem 2004;279(19): 20471-9.
56. Chaineau M, Danglot L, Galli T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. FEBS letters 2009;583(23): 3817-26.
57. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KEM, Sadik M, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. Sci Rep 2016;6: 22519.
58. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al . Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. Nature 2004;428(6983): 664.
59. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 2006;354(17): 1813-26.
60. Marbán E. A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies. Nat Biomed Eng 2018;2(6): 353.
61. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. Nat Biotechnol. 2007;25(9): 1015.
62. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells

differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002;105(1): 93-8.

63. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001;410(6829): 701.
64. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E .Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. Cochrane Database Syst Rev 2016(12).
65. Mathur A, Fernández-Avilés F, Dimmeler S, Hauskeller C, Janssens S, Menasche P, et al. The consensus of the Task Force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for the treatment of acute myocardial infarction and heart failure: update 2016. Eur Heart J 2017;38(39): 2930-5.
66. Sakthiswary R, Raymond AA. Stem cell therapy in neurodegenerative diseases: From principles to practice. Neural Regen Res 2012;7(23): 1822.
67. Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. Transl Res 2010;156(3): 155-60.
68. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, Van Den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. JBJS 2003;85(10): 1927-35.
69. Elbuluk A, Einhorn TA ،Iorio R. A comprehensive review of stem-cell therapy. JBJS Rev 2017;5(8): e15.
70. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 2004;95(1): 9-20.
71. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. Circulation 2005;112(10): 1451.
72. McBride C, Gaupp D, Phinney D. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by realtime PCR. Cytotherapy 2003;5(1): 7-18.
73. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. Ann Thorac Surg 2003;75(1): 204-9.
74. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. American journal of respiratory cell and molecular biology. Am J Respir Cell Mol Biol 2005. 33(2): 145-52.
75. Rogers TB, Pati S, Gaa S, Riley D, Khakoo AY, Patel S, et al. Mesenchymal stem cells stimulate protective genetic reprogramming of injured cardiac ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol 2011;50(2): 346-56.
76. Nascimento DS, Mosqueira D, Sousa LM, Teixeira M, Filipe M, Resende TP, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. Stem Cell Res Ther 2014;5(1): 5.
77. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, Brinkmann E, Fischer P, Meyer GP, et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell

therapy trials after myocardial infarction. Eur Heart J 2008;29(23): 2851-8.

78. Angoulvant D, Ivanes F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. J. Heart Lung Transplant 2011;30(1): 95-102.
79. Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives. Cancer Res. 2017;77(23): 6480-6488.
80. Lakhal S, Wood MJ. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery. Bioessays 2011;33(10): 737-41.
81. Salehi M, Sharifi M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. J Cell Physiol 2018;233(9): 6370-80.
82. Antimisiaris S, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. Pharmaceutics 2018;10(4): 218.
83. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. Int J Mol Sci 2014;15(3): 4142-57.
84. Properzi F, Logozzi M ،Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. Biomark Med 2013;7(5): 769-78.
85. Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of Exosome-Based Therapeutics and Challenges in Production of Exosomes Eligible for Therapeutic Application. Biol Pharm Bull 2018;41(6): 835-42.
86. Schreibelt G, Bol KF, Westdorp H, Wimmers F, Aarntzen EH, Duiveman-de Boer T, et al. Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells. Clin Cancer Res 2016;22(9): 2155-66.
87. Cosme J, Liu PP, Gramolini AO. The cardiovascular exosome: current perspectives and potential. Proteomics 2013;13(10-11): 1654-9.
88. Levänen B, Bhakta NR, Paredes PT, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol 2013;131(3): 894-903. e8.
89. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Morimura R, Hirajima S, Tsujiura M, et al. Circulating miR-18a: a sensitive cancer screening biomarker in human cancer. in vivo 2014;28(3): 293-7.
90. Boufraqech M, Zhang L, Jain M, Patel D, Ellis R, Xiong Y, et al. miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. Endocr Relat Cancer 2014;21(4): 517-31.
91. He Y, Deng F, Yang S, Wang D, Chen X, Zhong S, et al. Exosomal microRNA: a novel biomarker for breast cancer. Biomark Med 2018;12(2): 177-88.
92. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. Am J Physiol Renal Physiol 2014;306(11): F1251-F9.
93. Butz H, Nofech-Mozes R, Ding Q, Khella HW, Szabó PM, Jewett M, et al. Exosomal microRNAs are diagnostic biomarkers and can mediate cell–cell communication in renal cell carcinoma. Eur Urol Focus 2016;2(2): 210-18.
94. Turay D, Khan S, Diaz Osterman CJ, Curtis MP, Khaira B, Neidigh JW, et al. Proteomic profiling of serum-derived exosomes from ethnically diverse prostate cancer patients. Cancer Investig 2016;34(1): 1-11.

95. Jakobsen KR, Paulsen BS, Bæk R, Varming K, Sorensen BS, Jørgensen MM. Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma. J Extracell Vesicles 2015;4(1): 26659.
96. Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, et al. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. BMC Cancer 2014;14(1): 176.
97. Shtam TA, Kovalev RA, Varfolomeeva EY, Makarov EM, Kil YV, Filatov MV. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. Cell Cell Commun Signal 2013;11(1): 88.
98. Theodoraki M-N, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical significance of PD-L1+ exosomes in plasma of head and neck cancer patients. Clin Cancer Res 2018;24(4): 896-905.
99. André F, Chaput N, Schartz NE, Flament C, Aubert N, Bernard J, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. J Immunol 2004;172(4): 2126-36.
100. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. Biomaterials 2014;35(7): 2383-90.
101. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. J Control Release 2015 .199: 145–55
102. Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi D-S, Roh T-Y, Park J, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. ACS nano 2013;7(9): 7698-710.
103. Saari H, Lazaro-Ibanez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M. Microvesicle-and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. J Control Release 2015;220: 727-37.
104. Pascucci L, Coccè V ،Bonomi A, Ami D, Ceccarelli P, Ciusani E, et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. J Control Release 2014;192: 262-70.
105. Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. Pharm Res 2015;32(6): 2003-14.
106. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. Mol Ther 2011;19(10): 1769-79.
107. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. Mol Ther 2010;18(9): 1606-14.
108. Kalani A, Chaturvedi P, Kamat PK, Maldonado C, Bauer P, Joshua IG, et al. Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury. Int J Biochem Cell Biol 2016;79: 360-369.
109. Lunavat TR, Jang SC, Nilsson L, Park HT, Repiska G, Lässer C ،et al. RNAi delivery by

exosome-mimetic nanovesicles–Implications for targeting c-Myc in cancer. Biomaterials 2016;102: 231-8.

110. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. J Control Release 2015;207: 18-30.
111. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. Cell Res 2014;24(6): 766.
112. Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. Int J Nanomedicine.2012;7: 1525.
113. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Stem Cell Biol 2006;30(1): 3.22.
114. Ohno S-i, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. Mol Ther 2013;21(1): 185-191.
115. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. J Biotechnol 2013;165(2): 77-84.
116. Cooper JM, Wiklander PO, Nordin JZ, Al-Shawi R, Wood MJ, Vithlani M, et al. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. Mov Disord 2014;29(12): 1476-1485.
117. Grapp M, Wrede A, Schweizer M, Hüwel S, Galla H-J, Snaidero N, et al. Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. Nat Commun 2013;4: 2123.
118. Lionetti V, Bianchi G, Recchia FA, Ventura C. Control of autocrine and paracrine myocardial signals: an emerging therapeutic strategy in heart failure. Heart Fail Rev 2010;15(6): 531-542.

Review Article

EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR THERAPEUTIC APPLICATIONS: A REVIEW

Reza Rahbarghazi[1], Jafar Rezaie[2]

Received: 09 Feb, 2019; Accepted: 27 Apr, 2019

Abstract

Background & Aims: Extracellular vesicles are double phospholipid layer vesicles releasing from several cells. These particles contain bio-molecules including mRNA, miRNA, DNA, proteins, and lipids which play a pivotal role in the cell to cell communication. Once delivered, they participate to change target cell function, fate, morphology, differentiation, and growth. The present study is a review article conducted to study the molecular mechanisms involved in the exosomes biogenesis and their therapeutic applications.

Materials & Methods: In the present study, the articles indexed in Scopus, ISI, and PubMed databases were reviewed. Keywords such as extracellular vesicles, exosome, ESCRT, and MVB were used to search the studies. An assembly of 118 articles related to exosome published from 2000 to 2018, were studied.

Results: Exosomes, nano-vesicles ranging from 30-120 nm, are a subfamily of extracellular vesicles secreting from almost cells. The interacted molecular mechanisms involve in the formation, secretion, and uptake of these vesicles. Previous studies showed that exosomes have a pivotal role in the physiological and pathophysiological condition. The findings suggest that exosomes could be used as biomarkers and shuttles of therapeutic agents, especially in the case of diagnosis and therapy of diseases.

***Conclusion*:** Exosomes actively participate in the control of biological processes. They can serve as a tool for diagnosis and therapy of various diseases. In spite of the progress in the biology of exosomes and their application, there are still more questions about their application.

Keywords: Extracellular vesicles; Exosome; Biomarker; Drug delivery

Address: Solid Tumor Research Center, Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Shafa St., Ershad Blvd., Urmia, Iran
Tel: +989148548503
Email: J.rezaie88@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2019: 30(3): 206 ISSN: 1027-3727

[1] Department of Applied Cell Sciences, Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Solid Tumor Research Center, Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)