

اثرات اگزوزوم‌های منشأ گرفته از سلول‌های خونی بر ترمیم زخم‌های مزمن

چکیده

علیرضا صادقی مقدم بیجاری¹

مهدی علیجانیان زاده^{2*}

هدی کشمیری نقاب³

محمدحسن سهیلی فر⁴

مقدمه: امروزه ترمیم زخم‌های حاد و مزمن مانند زخم پای دیابتی و زخم‌های تروماتیک، یکی از چالش‌های مورد بحث در علم پزشکی می‌باشد. تا به امروز جهت ترمیم زخم‌هایی که به درستی ترمیم نمی‌شوند، روش‌های درمانی متعددی ارائه شده‌اند که از جدیدترین آنها می‌توان به درمان به‌واسطه وزیکول‌های خارج سلولی، مشخصاً "اگزوزوم‌ها" اشاره نمود. اگزوزوم‌ها، وزیکول‌هایی با ابعاد نانواند که از طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله انواع سلول‌های خونی ترشح می‌شوند و به‌واسطه محموله‌هایی که دربردارند، می‌توانند اثراتی بر بافت‌های هدف خود بگذارند که در ترمیم زخم حائز اهمیت بوده و می‌توان از آنها به‌عنوان درمان زخم‌های مذکور بهره برد. این مقاله مروری است بر مهمترین تحقیقات انجام‌شده بر روی اگزوزوم‌هایی که از انواع سلول‌های خونی منشأ گرفته‌اند و نیز بررسی نتایج آزمایشگاهی و بالینی که هرکدام از خود نشان داده‌اند.

روش: به‌منظور بررسی تحقیقات صورت‌گرفته، تمام مقالات با محوریت بکارگیری اگزوزوم‌های خونی به‌علاوه تعدادی از مقالات مرتبط با کلیات اگزوزوم در پایگاه‌های داده PubMed و google scholar در بازه زمانی 2005 تا 2024 انتخاب‌شده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: برطبق یافته‌ها، اگزوزوم‌های حاصل از برخی سلول‌های خونی به‌ویژه ماکروفاژ و پلاکت توان مداخله در توسعه زخم را داشته و علی‌الخصوص در مراحل اولیه ترمیمی مانند مرحله هموستاز و التهاب نقش موثری نشان داده‌اند.

1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

2. استادیار بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

3. استادیار بیوفیزیک، گروه لیزر پزشکی، پژوهشکده یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران، ایران

4. استادیار پزشکی مولکولی، گروه لیزر پزشکی، پژوهشکده یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران، ایران

نویسنده مسئول: دکتر مهدی علیجانیان‌زاده -
دکتر هدی کشمیری نقاب

پست الکترونیک:

alijanian@khu.ac.ir

hodakeshmiri@ut.ac.ir

کلید واژه‌ها: اگزوزوم، سلول‌های خونی، ترمیم زخم

مقدمه

زخم‌ها به‌عنوان آسیب‌هایی نسبتاً رایج، مکرراً بر روی پوست افراد جامعه ایجاد می‌شوند و برای آنها ایجاد درد و نیز چالش‌های اجتماعی می‌کنند. بعضاً زخم‌ها به لحاظ وخامت از حد نرمال فراتر رفته و درمان آنها با تاخیر مواجه می‌شود که به آنها زخم‌های مزمن گفته می‌شود. لذا نیاز است یک روش درمانی موثر برای این مسئله ارائه شود (1). تاکنون روش‌های ترمیمی زیستی، فیزیکی و شیمیایی مختلفی نظیر لیزر، درمان به‌واسطه خلاء¹، فراصوت²، پوست مهندسی زیستی شده³ و نیز تزریق فاکتورهای رشد ارائه شده‌اند (2). همچنین سلول‌درمانی⁴ به‌عنوان یکی از روش‌های مورد توجه در سال‌های اخیر اثرات جالب توجهی از خود نشان داده است. در میان سلول‌ها، سلول‌های بنیادی سهم عمده‌ای از این نوع درمان را به خود اختصاص داده و انواعی از این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علت این توجه را می‌توان قابلیت تمایز آنها به سلول‌های مورد نیاز در محل بافت بیان نمود (3). سلول‌های خونی به‌ویژه پلاکت کاندیداهای دیگر در سلول‌درمانی بوده‌اند که این انتخاب با در نظر گرفتن نقش این سلول‌ها در فرایندهای ترمیمی صورت گرفته است (4). استفاده از این سلول‌ها اگرچه اثربخشی خود را نشان داده‌اند اما مسائلی از قبیل طول عمر کوتاه پس از الحاق به محل زخم، نیازمندی‌های رشد پیچیده و همچنین خطر ایجاد تومور در استفاده از سلول‌های بنیادی مانع از معرفی روش مذکور به‌عنوان درمان قطعی شده‌اند (5-7). در سوی دیگر، از آنجاکه عمده اثر القایی این سلول‌ها به‌واسطه محتوی ترشحاتی آنها به خارج از سلول ایجاد می‌شود، پیشنهاد شده است که به جای بکارگیری مستقیم سلول‌ها، از وزیکول‌های خارج سلولی‌شان به‌صورت خالص شده استفاده شود (8).

آگزوزوم‌ها⁵ یکی از برجسته‌ترین انواع وزیکول‌های خارج سلولی‌اند. این وزیکول‌ها تقریباً توسط تمام سلول‌های بدن موجودات زنده به‌منظور ایجاد ارتباطات بین سلولی ترشح می‌شوند. آنها به موجب اندازه کوچک‌تر (30-150 نانومتر) و نیز نوع

شکل‌گیری‌شان از سایر وزیکول‌های خارج سلولی متمایز می‌شوند (8). ساختار آگزوزوم‌ها متشکل است از یک غشا دولایه فسفولیپیدی در کنار انواعی از سایر لیپیدها نظیر کلسترول و فسفاتیدیل سرین. به‌علاوه انواع پروتئین‌های متعددی در تشکیل ساختارشان شرکت می‌کنند. پروتئین‌های اسکلت سلولی، کانال‌های غشایی و پروتئین‌های چسبندگی مثال‌هایی از این پروتئین‌ها هستند. همچنین آگزوزوم‌ها دربرگیرنده محموله‌های مختلفی از جنس پروتئین، نوکلئیک اسیدند. محتوی پروتئینی‌ای که آگزوزوم‌ها حمل می‌کنند عبارت است از آنزیم‌ها (مثال پروتئینازهای ماتریکس)، پروتئین‌های سیگنالینگ (Wnt4/3)، پروتئین‌های شوک حرارتی⁶ (hsp70/72/90) و فاکتورهای رشد (VEGF/TGFβ) (9,10). در کنار پروتئین‌ها، محموله‌های نوکلئیک اسیدی با تغییر میزان بیان پروتئین‌های مختلف به شکل مستقیم و غیرمستقیم در توسعه ترمیم زخم ایجاد مداخله می‌کنند. miRNAها (miRNA-122 / miRNA let7c / miRNA-124) را می‌توان مهمترین این نوکلئیک اسیدهای آگزوزومی معرفی نمود. این RNAهای کوتاه غیرکدشونده نقش کلیدی در مهار بیان پروتئین‌های مختلف ایفا می‌کنند (11).

ترشح آگزوزوم‌ها با فرورفتن غشا سلول به داخل و ایجاد اندوزوم اولیه آغاز خواهد شد. در ادامه این وزیکول‌ها با تشکیل یک ساختار چند وزیکولی⁷ (MVB) بالغ‌شده و محتوی لازم را جذب می‌کنند. اگرچه تعداد زیادی‌شان به لیزوزوم فرستاده شده و بازیافت می‌شوند اما وزیکول‌های بالغ ثانویه به‌صورت آگزوزوم به خارج سلول آزاد می‌شوند (12).

یکی از چالش‌های پیش رو درباره آگزوزوم‌ها را می‌توان استخراج آنها دانست از آنجا که ابعادی بسیار کوچک داشته و با روش‌های ساده و معمول قابل تخلیص نمی‌باشند. با این حال، روش‌های رایجی که برای استخراج آگزوزوم‌ها استفاده شده‌اند عبارتند از اولترا سانتریفیوژ⁸، اولترافیلتراسیون⁹، روش رسوبی و روش‌های جداسازی بر پایه خواص ایمونولوژیک (13). استفاده از آگزوزوم‌ها در زمینه‌های مختلف به‌ویژه در ترمیم زخم اثرات

1. vacuum therapy
2. ultrasound therapy
3. bioengineered skin
4. cell therapy
5. exosome

6. heat shock proteins
7. multivesicular body
8. ultracentrifuge
9. ultrafiltration

انواع سلول‌های خونی

خون حدود 7 درصد وزن بدن را به خود اختصاص می‌دهد و در هر دقیقه تقریباً 5 لیتر خون توسط قلب به سراسر بدن پمپ می‌شود. لذا می‌توان خون را بخش مهمی از بدن دانست. خون متشکل است از پلاسما و سلول‌های خونی که در پلاسما شناورند. سلول‌های خونی عبارتند از گلبول‌های قرمز، پلاکت، گلبول‌های سفید، ماستوسیت‌ها، سلول‌های دندریتی و لیگودندریتی (18). همه این سلول‌ها به مانند سایر سلول‌ها، چه در شرایط فیزیولوژیک و چه پاتولوژیک، آگروزوم‌های خاص خود را ترشح می‌کنند (19).

پلاکت‌ها

پلاکت‌ها گروهی از سلول‌های خونی هستند که فاقد هسته‌اند. این سلول‌ها در روزهای اولیه پس از ایجاد زخم نقش موثری در ترمیم آن ایفا می‌کنند. در واقع پلاکت‌ها جزو اولین سلول‌هایی هستند که در محل ایجاد زخم حاضر شده، پاسخ ترمیمی می‌دهند.

با این حال اثرات آنها محدود به مراحل اولیه نمی‌باشد بلکه پلاکت‌ها بر تمام مراحل ترمیم زخم که عبارتند از هموستازی، التهاب، ازدیاد سلولی و بازآرایی ماتریکسی اثر گذارند. پلاکت‌ها در هر مرحله بسته‌های ترشحی‌ای را به خارج از خود آزاد می‌کنند که از جمله مهمترین آنها گرانول‌های آلفا، گرانول‌های چگال²، گرانول‌های لیزوزومی، میکرو ووزیکول‌ها و آگروزوم‌ها می‌باشند و هر کدام به‌عنوان ذخایر خارج سلولی برای رهاسازی فوری یا تاخیری فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های چسبندگی و سایر مولکول‌های سیگنالینگ عمل می‌کنند (15). اگرچه این مواد به‌خودی‌خود قابلیت ترشح شدن دارند اما ترشح در قالب‌های ووزیکولی می‌تواند آنها را در غلظت بالاتر و کارایی بیشتر عرضه کند (20).

یکی از معیارهای مهم در ترمیم زخم، افزایش تکثیر و ازدیاد سلولی است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که آگروزوم‌های پلاکتی توانایی خوبی در افزایش تکثیر سلول‌های مختلفی از جمله فیبروبلاست، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند. در مقایسه با سلول‌های معمولی، آنهایی که با این آگروزوم‌ها تیمار

قابل توجهی از خود به نمایش گذاشته است. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که آگروزوم‌های استخراج‌شده از سلول‌های مختلف مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی¹⁴ (MSCs) می‌توانند موجب بهبود سریع‌تر زخم‌های حاد و مزمن شوند (14). این نانو ووزیکول‌ها نقش خود در ترمیم زخم را به‌واسطه تحریک فرآیندهای مختلف که عبارتند از ترشح ماتریکس خارج سلولی، ازدیاد تکثیر و مهاجرت سلولی، القا رگزایی و تنظیم مراحل التهابی در محل ایجاد زخم ایفا می‌کنند (15).

اگرچه در سال‌های اخیر، آگروزوم‌های حاصل از سلول‌های بنیادی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و بررسی‌های متعددی فوائد آگروزوم‌های حاصل از آنها را آشکار ساخته‌اند اما ترشح آگروزوم صرفاً محدود به آنها نیست بلکه طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از جمله فیبروبلاست‌ها، کراتینوسایت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های ایمنی، آگروزوم‌های خاص خود را ترشح و به‌واسطه آنها اثرات القایی منحصربه‌خود را ایجاد می‌کنند (16). به‌علاوه سلول‌های خونی نظیر گلبول‌های سفید و قرمز، پلاکت‌ها و ماکروفاژها نیز آگروزوم‌های ویژه را ترشح می‌کنند که هر کدام می‌توانند بر ترمیم پوست به‌ویژه در تنظیم فاز التهابی اثر مثبت بگذارند (17). در این بررسی سعی بر آن است تا مروری بر مهمترین سلول‌های خونی ترشح‌کننده آگروزوم انجام شود و نیز ترکیبات مختلف آگروزومی و نیز عملکردهای آنها که باعث ترمیم زخم می‌شوند به‌طور مجزا مورد بررسی قرار گیرند.

روش تحقیق

براساس پیشینه بیان‌شده، در این تحقیق تمامی مقالات اعم از پژوهشی و مروری با عناوین مرتبط با بکارگیری آگروزوم‌های خارج سلولی (یا به‌عبارت کلی ووزیکول‌های خارج سلولی) منشا گرفته از انواع سلول‌های خونی با هدف بهبود زخم از میان منابع استخراج و مورد مطالعه قرار گرفتند. مقالات از پایگاه‌های داده PubMed و google scholar دریافت‌شده و صرفاً محدودیت زمانی در بازه سال‌های 2005 تا 2024 میلادی اعمال گردیده است. مقالات تکراری و مطالب غیرمرتبط در مقالات حذف‌شده و یافته‌های مورد هدف طبقه‌بندی شدند.

2. dense granules

1. Mesenchymal stem cells

شوند در یک بازه (24-48) ساعته اختلاف مشهودی در توان تکثیر خود به نمایش می‌گذارند (20).

رگزایی یکی دیگر از صفات مورد بررسی در توان‌سنجی ترمیم زخم است. تشکیل تیوب‌های عروقی جدید متشکل از سلول‌های اندوتلیال پوستی اهمیت ویژه دارد. در مشاهدات همچنین اگزوزوم‌های پلاکتی باعث ایجاد این عروق با نرخ بالاتر از سلول‌های معمولی شده‌اند. سلول‌های اندوتلیال پوست انسان در اثر 5 روز تیمار اگزوزومی مجراهای عروقی طول‌تری نسبت به حالت معمول تشکیل داده‌اند. بررسی‌های بالینی بر روی پوست 11 داوطلب، با گذشت 30 روز زخم‌های ایجاد شده بر روی پوست همه افراد در نتیجه تیمار این اگزوزوم‌ها تماماً بسته شده بدون آن که اثر زخم¹ از خود به جای بگذارد (20).

از آنجا که گونه‌های فعال اکسیژن² (ROSS) مانع رشد و تکثیر سلول‌های پوستی می‌شوند تولید و حضورشان در موقعیت زخم یکی از موانعی است که باعث کندی روند ترمیم می‌شود. لذا ضروری است تا طی فرایندی خنثی شوند. اگزوزوم‌های پلاکتی به‌ویژه زمانی که با یک هیدروژل بر روی زخم اعمال شوند توانایی آن را دارند تا این اثر این مواد را کاهش دهند (21).

از دیگر اثرات اگزوزوم‌های پلاکتی می‌تواند به تبدیل فرم پیش‌التهابی (M1) به ضدالتهابی (M2) ماکروفاژها اشاره نمود. ماکروفاژها یکی از عناصر کلیدی ترمیم زخم در تمامی مراحل آن به‌شمار می‌روند. تبدیل فرم M1 به M2 آنها به درستی نقش مهمی در ایجاد مرحله هموستاز و التهاب صحیح دارد. ارزیابی این ویژگی در یکی از تحقیقات نشانگر این امر است که ماکروفاژها تحت اثر این رده از اگزوزوم‌ها به نسبت حالت عادی با نرخ بالاتری به فرم M2 تبدیل شده‌اند (21).

پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)

امروزه با توجه به این امر که پلاکت‌ها به‌واسطه محتوای ترشحی خود عمده اثر خود را القا می‌کنند، روشی نوین ابداع شده است مبنی بر آن که به جای بکارگیری مستقیم این سلول‌ها در محل زخم، پلاسمایی که پلاکت‌ها در آن اگزوزوم‌های خود را ترشح کرده‌اند بوسیله سانتریفیوژ کردن از آنها جداسازی کرده و یک

پلاسمای غنی شده از محتوی پلاکتی³ (PRP) برای اعمال بر روی زخم‌ها تهیه شود (22). با توجه به آمارها اگر چه استفاده از این روش نسبت به درمان روتین زخم در کلینیک‌ها یک افزایش جزئی در قیمت داشته که این هزینه به مراحل آماده‌سازی آن برمی‌گردد اما استفاده از PRP باعث کاهش چشمگیر در طول مدت بستری بیماران و افزایش احتمال ترمیم شده است (23).

اگزوزوم‌های PRP در بررسی‌های آزمایشگاهی و بالینی صلاحیت ترمیمی خود را به نمایش گذاشته‌اند. در یک تحقیق، PRP اگزوزوم‌ها به همراه یک هیدروژل مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که ترکیب اخیر باعث افزایش تکثیر و مهاجرت سلول‌ها می‌شود. در اثر این اگزوزوم‌ها بیان فاکتورهای رشد EGF، VEGF، IGF-1، TGF- β 1 مشخصاً افزایش داشته‌اند که در مجموع نشانگر القا فرایندهای ترمیمی در پوست‌اند (24).

مطالعه بر روی مسیرهای سیگنالینگ نشان داده‌اند که اگزوزوم‌های ناشی از PRP عمدتاً باعث فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ YAP⁴ می‌شوند. بدین ترتیب که تحت اثر TGF β ، پروتئین Rho GTPase فعال شده، پروتئین‌های سیگنالینگ مختلفی را در پایین دست خود فعال می‌کند که نهایتاً منجر به دفسفریلاسیون YAP می‌شوند. دفسفریلاسیون موجب انتقال YAP به درون هسته و اثرگذاری آن بر ژن‌های مرتبط با تکثیر سلولی در فیبروبلاست خواهد شد. علاوه بر مسیر YAP، این اگزوزوم‌ها می‌توانند مسیر PI3K/Akt و Erk1/2 را نیز فعال کنند. این مسیرها جزو مکانیسم‌های زیربنایی در تکثیر سلول‌های اندوتلیال و فرایند رگزایی به‌شمار می‌روند (25).

همچنین اثر ترکیب ژل با PRP-EXO در مورد تبدیل فرم ماکروفاژی هم بررسی شده است. در این بررسی فاکتورهای پیش‌التهابی و ضدالتهابی ماکروفاژها در حالت معمول و نیز در اثر تحریک اگزوزومی مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده است که سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر IL-1 β و TNF- α در مقادیر بیشتری نسبت به حالت تحریک شده بیان می‌شوند. در مقابل سایتوکاین‌های ضدالتهابی به‌ویژه IL-4 و IL-10 در نمونه تحریک شده به‌واسطه اگزوزوم بیان بالاتری داشته‌اند. این شواهد

3. Platelet-rich plasma

4. YES-associated protein

1. scar

2. reactive oxygen species

ثابت کرده‌اند که تیمار سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان² (HUVEC) با آگزوزوم‌های M2 موجب بهبود صفات مرتبط با رگزایی شامل تکثیر، مهاجرت و تشکیل تیوب این سلول‌ها می‌شود. VEGF که عمومی‌ترین فاکتور برای سنجش رگزایی شناخته می‌شود پس از افزودن این وزیکول‌ها به میزان قابل توجهی افزایش داشته است. برطبق نتایج حاصله، آنها این اثر را به واسطه فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Akt/mTOR ایجاد می‌کنند. آگزوزوم‌های M2 غنی از miR-21 اند که می‌تواند بیان PTEN را مهار کرده در پی آن Akt/mTOR تحریک شده نهایتاً منجر به افزایش نرخ رگزایی خواهد شد. همچنین اعمال این آگزوزوم بر روی پوست موش نیز موثر واقع شده بدین تریب که طی 15 روز پس از ایجاد زخم کاملاً زخم را بسته و اثر زخمی به مراتب کوچک‌تری از خود به جای گذاشته است (29,30).

این آگزوزوم‌ها همچنین اثرات ضدالتهاب نیز از خود نشان داده‌اند. همان‌طور که پیشتر بیان شد فاکتور و سایتوکاین‌های مختلف در ایجاد و خاتمه فاز التهابی دخیل‌اند. اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای پیش‌التهابی نظیر TNF-a و IL-6 و مقایسه مقادیر در حالت عادی و حالت تیمار با آگزوزوم M2، کاهش قابل توجه آنها تحت اثر تیمار را آشکار ساخت که موید این فرض است که آگزوزوم‌های M2 با اثر بر فاز التهابی موجب ترمیم زخم می‌شوند (30).

جالب است که آگزوزوم‌های M2، نه تنها بر سایر سلول‌ها اثر گذاشته بلکه خود ماکروفازها را نیز آماج اثر خود قرار می‌دهند. آگزوزوم‌های ماکروفازی M2 قابلیت آن را دارند که ماکروفازها را از فاز التهابی به فاز ضدالتهابی گذار داده و به نوعی ایجاد اثر خود تنظیمی مثبت را القا نمایند (31).

علاوه بر استفاده از آگزوزوم‌ها به تنهایی امروزه بحث بر آن است که اولاً با ترکیب این وزیکول‌ها با سایر روش‌های درمانی، اثر بخشی آنها را افزایش دهند و ثانیاً با استفاده از تثبیت آنها بر روی مواد خاص، نیمه عمر و پایداری آنها در بافت را افزایش دهند. در یکی از تحقیقات اخیر، اثر آگزوزوم‌های ماکروفازی که بر روی یک ساختار ریز سوزنی³ تثبیت شده‌اند بررسی شده است.

بیانگر آن است که آگزوزوم‌های PRP ترکیب‌شده با ژل توانسته‌اند ماکروفازها را ملزم به تغییر فاز دهند (24).

ماکروفازها

ماکروفازها سلول‌هایی خونی با چند عملکردند که اولین خط سیستم ایمنی بدن انسان را در مقابل پاتوژن‌ها ایجاد می‌کنند. آنها با انجام عمل ذره‌خواری¹ موجب حذف این ذرات میکروبی می‌شوند. برحسب نیاز بافتی، ماکروفازها از فرم تمایز نیافته M0 به دو فرم پیش‌التهابی M1 و ضدالتهابی M2 مشاهده می‌شوند. تبدیل فرم ماکروفازی بر اثر القا سایر سلول‌ها انجام می‌شود. به‌عنوان مثال، تحت اثر TNF- α و IL-12، این سلول به فرم پیش‌التهابی درمی‌آیند در حالی که IL-10، IL-4 و IL-13 آنها را به سمت فرم ضدالتهابی سوق می‌دهد. ماکروفازها نه تنها از آگزوزوم‌های سایر سلول‌ها اثر می‌گیرند بلکه خود نیز به میزان فراوانی آگزوزوم در خون ترشح می‌کنند که برحسب فرم آنها محتوی متفاوتی را دربردارد. به‌طور مثال آگزوزوم‌های M1، miR326، بیشتری نسبت به فرم M2 دارند در حالی که آگزوزوم‌های M2، miR365، بیشتری را شامل می‌شوند. ماکروفازها به واسطه این آگزوزوم‌ها می‌توانند بیان متالوپروتئینازهای ماتریکسی (MMP) و نیز آنزیم‌ها و سایتوکاین‌های التهابی را تغییر دهند که به‌صورت شفاف در ترمیم زخم‌ها اهمیت ویژه دارد (26,27).

جدول 1. تفاوت‌های ماکروفازهای M1 و M2 (28)

تیپ ماکروفازی	مارکرها	فاکتورهای ترشچی	القا توسط
پیش‌التهابی (M1)	iNOS CD86 CD68 MHC II	TNF- α IL-6 IL-1 β MCP-1 IL-12 IL-23	IFN γ LPS
ضد‌التهابی (M2)	Arg-1 CD163 CD206 CD301	IL-10 TGF- β MCP-1 IL-12	IL-4 IL-13

مطالعه اثر آگزوزوم‌ها بر روی ترمیم زخم نشان داده است که آگزوزوم‌های منشا گرفته از ماکروفاز M2 توانایی آن را دارند که رگزایی را در بافت آسیب‌دیده افزایش دهند. بررسی‌ها بر روی آنها

2. human umbilical vein endothelial cell
3. micro needle

1. matrix metalloproteinase

این تثبیت باعث آزادسازی تدریجی آگزوزوم‌ها به بافت آسیب‌دیده و اثر دیرپا تر آنها خواهد شد. همچنین بر طبق اطلاعات پیشین، ایجاد یک شوک حرارتی خفیف می‌تواند تکثیر سلول‌های اندوتلیال را تحریک کند لذا در این بررسی از یک بستر هیدروژل پلی دوپامینی حساس به نور در ناحیه زخم استفاده شد که در اثر تابش لیزر 808 نانومتری ایجاد یک شوک حرارتی خفیف در ناحیه زخم می‌کند (تقریباً 40 درجه سانتیگراد). ترکیب آگزوزوم‌های تثبیت‌شده بر روی ریز سوزن‌ها به همراه شوک حرارتی نسبت به حالت عادی (کنترل) و نیز بکارگیری مجزای هر کدام از این روش‌ها اثرات ترمیمی بیشتری را از خود به نمایش گذاشته است که نشان‌دهنده موثر بودن این نوع از درمان ترکیبی در باز ساخت پوست است (32).

یکی از موضوعات مورد توجه درباره درمان به‌واسطه آگزوزوم، بارگذاری سایر مواد دارویی درون آگزوزوم‌ها و استفاده از صفات مطلوب آگزوزوم‌ها در دارورسانی و نیز ترکیب اثر محتوی طبیعی آگزوزومی در کنار داروی بارگذاری‌شده به‌صورت مصنوعی می‌باشد. کورکومین¹، ماده موثره‌ای که از زردچوبه استخراج می‌شود، چه در گذشته و چه در پزشکی امروز به‌عنوان درمان بیماری‌های مختلفی نظیر دیابت استفاده می‌شود. اثرات آن شامل خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدسرطانی است. کورکومین توانایی آن را دارد که التهاب را در بیماری‌ها کاهش دهد (33). پیشنهاد شده است که بارگذاری کورکومین بر روی آگزوزوم‌ها می‌تواند هم‌افزایی مثبتی در ترمیم زخم ایجاد کند. آگزوزوم‌های ماکروفاژی که کورکومین درون آنها بارگذاری شود می‌توانند باعث کاهش التهاب و از بین بردن ROS ها در بافت آسیب‌دیده شوند و هم‌زمان تکثیر و مهاجرت سلولی را در آن افزایش دهند. به‌طور کلی می‌توان بیان نمود که روش‌های درمانی دیگر می‌توانند نقش مکمل را در بهبود عملکرد این آگزوزوم‌ها داشته باشند (34).

گلوبول‌های قرمز

گلوبول‌های قرمز خونی یا "اریتروسیت‌ها"² را می‌توان به‌عنوان اصلی‌ترین و پرتعدادترین سلول‌های خون در نظر گرفت. از این جهت سهم عمده‌ای از آگزوزوم‌های خونی را به خود اختصاص خواهند داد. عمده مطالعات بر روی آگزوزوم‌های اریتروسیتی، بر روی خون‌های ذخیره‌ای در بانک خون انجام شده است. بررسی این سلول‌ها نشان‌دهنده آن است که با گذر زمان پس از آغاز ذخیره‌سازی، اندازه اریتروسیت‌ها و نیز عملکرد غشایی‌شان کاهش می‌یابد. در کنار دلایلی نظیر افزایش تولید ROSها، یکی از علل اصلی این امر، ترشح مکرر آگزوزوم‌ها در نظر گرفته می‌شود. همان‌گونه که انتظار می‌رود در شرایط پاتولوژیک، ترشح این وزیکول‌ها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (35).

در کنار اجزای عمومی که در انواع آگزوزوم‌ها وجود دارند، آگزوزوم‌های اریتروسیتی حاوی اجزای اختصاصی‌ای نیز هستند از جمله پروتئین غشایی BAND3، آنزیم انیدراز کربنیک و هموگلوبین‌های تغییر یافته (19). miRNA ها نوکلئوتیدهای تکرار شده‌ای کوتاه غیرکدشونده‌اند که سلول‌ها برای القا یا مهار بیان ژن‌های مختلف آنها را ترشح می‌کنند. در آگزوزوم‌های گلوبول قرمز بالغ بر 78 نوع miRNA مختلف شناسایی شده است که به لحاظ تعداد، سهم عمده‌ای از آنها را miR125-b-5p، miR4454 و miR451a به خود اختصاص می‌دهند. نقش این miRNAها در تنظیم پاسخ ایمنی و تحریک ماکروفاژها و سلول‌های دندریتی بیان شده است (36).

اثرات این وزیکول‌ها بر ترمیم زخم در دو بخش قابل بررسی است:

الف) هموستاز و ایجاد لخته پس از ایجاد زخم

ب) ایجاد و القا پاسخ ایمنی در فاز التهابی

پس از ایجاد زخم بر روی پوست نخستین مرحله از ترمیم، ایجاد لخته به‌منظور جلوگیری از خونریزی است. یکی از اصلی‌ترین فرآیندها در ایجاد لخته تبدیل فیبرینوژن به فیبرین است که این فرایند توسط آنزیمی بنام ترومبین انجام می‌شود (37). تحقیقات نشان داده‌اند که آگزوزوم‌های گلوبول قرمز می‌توانند باعث افزایش و فعال‌سازی این آنزیم شوند. گلوبول‌های قرمز با افزایش تولید ترومبین فعال و متعاقباً تولید فیبرین نامحلول

2. Erythrocytes

1. Curcumin

نوروفیل‌ها، دیگر سلول‌های ایمنی هستند که به‌عنوان یکی از ابتدایی‌ترین سلول‌ها در مقابل پاتوژن‌ها عمل کرده و آنها را حذف می‌کنند. بررسی‌ها نشان‌دهنده‌اند که آگزوزوم‌های این سلول‌ها محتویاتی دربردارند که اثرات آنتی‌باکتریال داشته‌اند لذا می‌توان در پاکسازی بافت آسیب‌دیده حائز اهمیت باشند. همچنین این آگزوزوم‌ها در صورت بارگذاری فاکتورهای رشد، علاوه بر اثر آنتی‌باکتریال می‌توانند به‌طور مستقیم بر ترمیم زخم اثر گذارند (43,44).

برای لئوسیت‌های T/B، ماستوسیت‌ها و سایر سلول‌های خونی نیز آگزوزوم‌هایی شناسایی شده که هر کدام در مقابله با بیماری‌های مختلفی نقش داشته‌اند. از آنجاکه این سلول‌ها عموماً مرتبط با پیشبرد مراحل ایمنی‌زایی و التهابی‌اند، همگی توانایی آن را دارند که اثرات ترمیمی بر زخم را از خود نشان دهند که این امر مستلزم انجام تحقیقات بیشتر بر روی اثرات آنهاست (45).

بحث و نتیجه‌گیری

بر پایه نتایج تحقیقات مختلف، سلول‌های خونی مختلف به‌ویژه سلول‌های ایمنی در پاسخ به آسیب‌های پاتولوژیک و حتی در شرایط عادی فیزیولوژیک به‌طور متداوم آگزوزوم‌هایی به محیط خود ترشح می‌کنند. نتایج کار آزمایشگاهی و بالینی برخی از این آگزوزوم‌ها از جمله آگزوزوم‌های پلاکتی و ماکروفاژی حاکی از آن بوده که این سلول‌ها می‌توانند به‌عنوان رده‌های مورد اطمینان تولیدکننده آگزوزوم در نظر گرفته شوند و از آگزوزوم‌های آنها به‌عنوان درمان ناهنجاری‌های پوستی، مشخصاً زخم‌های پوستی استفاده شود. این آگزوزوم‌ها بر روی مسیرهای مختلف سیگنالینگ مانند Akt اثر گذاشته و در فرآیندهای ترمیمی مداخله می‌کنند. نتایج بررسی‌ها بر روی این رده از آگزوزوم‌ها این‌گونه اظهار می‌نمایند که آگزوزوم‌های خونی عموماً اثراتی مرتبط با مراحل ابتدایی ترمیم زخم، مشخصاً ایجاد هموستازی و التهاب شرکت دارند که این را می‌توان مرتبط با نقش خود این سلول‌ها دانست. در نتیجه بکارگیری آنها در مراحل ابتدایی پس از ایجاد زخم می‌تواند نتایج بهتری را بدنبال داشته باشند. با این حال عملکردشان صرفاً منحصر به هموستازی و التهاب نبوده بلکه تکثیر سلول‌های مختلف نظیر سلول‌های اندوتلیال نیز از این آگزوزوم‌ها تأثیر می‌گیرد.

در ایجاد لخته در محل خونریزی مشارکت‌کرده و باعث ایجا هموستاز موثر می‌شوند (19).

دومین مرحله پس از هموستاز، التهاب و فراخوانی سیستم ایمنی به محل آسیب‌دیده است. آگزوزوم‌ها در مقابل سیستم ایمنی هم نقش در ایجاد التهاب و هم نقش در تعدیل آن را دارند. آنها سایتوکاین‌های IL-13، IL-10، IL-5 و IL-1Ra را دربردارند که همگی موجب گذار از مرحله التهاب می‌شوند. از طرفی آنها موجب افزایش زنده‌مانی و تکثیر لئوسیت‌های T و B و نیز منوسیت‌ها می‌شوند. در این آگزوزوم‌ها میزان INFY، IL-17 و IL-9 به‌طور چشمگیری افزایش یافته که موجب توسعه لئوسیت‌های T helper 1/9/17 می‌شود.

به‌طورکلی می‌توان بیان کرد که آنها به طرز جالب توجهی با ایجاد اثرات دوگانه بر سیستم ایمنی به تنظیم پاسخ آن کمک می‌کنند و در پی آن ترمیم زخم مناسب را میسر می‌سازند (38).

آگزوزوم‌های سایر سلول‌های خونی

علاوه بر سلول‌هایی که بیشتر مورد بحث قرار گرفتند انواع دیگری از سلول‌های خونی نیز آگزوزوم‌های منحصر به فردی به داخل جریان خون ترشح می‌کنند که کمتر به اثرات آنها بر روی ترمیم زخم پرداخته شده است ولی نوید بخش آنند که بتوان از آنها در فرآیندهای ترمیمی استفاده نمود.

به‌عنوان مثال، سلول‌های دندریتی، گروهی از سلول‌های ایمنی موجود در خونند که از مغز استخوان منشأ گرفته و در ایمنی ذاتی نقش دارند. این سلول‌ها ارائه‌کننده‌های آنتی‌ژن به سلول‌های لئوسیت T هستند. آنها به دو طریق مستقیم و غیرمستقیم باعث فعال‌سازی لئوسیت‌های T در شرایط التهابی می‌شوند. در روش مستقیم، سلول‌های دندریتی کمپلکس‌های پپتیدی MHC II را بیان می‌کنند که به سلول‌های T بچسبند و در روش غیرمستقیم MHC II های ترشحی به دندریت سل‌های دیگر منتقل می‌شوند. این سلول‌ها با انتقال MHC II به دندریت سل‌های غیرفعال دیگر به‌واسطه آگزوزوم‌ها، باعث فعالیت آنها و متعاقباً فعال‌سازی بیشتر لئوسیت‌های T می‌شوند (39,40). این آگزوزوم‌ها با فعال‌سازی لئوسیت‌های T و تبدیل ماکروفاژها به فرم ضدالتهابی توانسته‌اند فاز التهابی را متعادل‌نموده و زخم ایجادشده در پی سکنه میوکاردی را بهبود ببخشند (41,42).

علیرغم مزایا، کاربرد آگزوزوم‌ها همچنان با چالش‌هایی همراه است که از جمله آنها می‌توان به نحوه جداسازی آنها و نیز مقدار بازده آگزوزومی ناشی از سلول‌ها اشاره نمود. روش‌های مورد استفاده در استخراج آگزوزوم‌ها اگرچه در ابعاد تحقیقاتی نسبتاً موفق ظاهر شده‌اند اما کاربردی‌بودن آنها برای تهیه آگزوزوم در ابعاد تجاری و استفاده بالینی مورد ابهام است.

میزان و کیفیت ترمیم یک درمان در مقایسه با حالت معمول شاخصه‌ای مهم در بیان کارآمدی آن برای کاربردهای بالینی به‌شمار می‌رود. اگرچه آگزوزوم‌های خونی به تنهایی در امر ترمیم زخم توانا ظاهر شده‌اند اما برخی تحقیقات نشانگر این است که استفاده آنها در ترکیب با سایر داروها و روش‌های درمانی می‌تواند اثر بخشی آنها را ارتقاء داده موجب بهبود سریع‌تر زخم‌ها شود. درمان آگزوزومی و سایر روش‌های درمانی می‌توانند در کنار هم نقش مکمل ایفا کرده و درمانی جامع‌تر ارائه دهند.

اثر بخشی آگزوزوم‌های ماکروفاژی، پلاکتی و اریتروسیتهی در مورد ترمیم زخم تا حدود مطلوبی مورد بررسی قرار گرفته است. با این حال همچنان اطلاعات موجود درباره آنها جای بحث دارد. از طرفی بیشتر آگزوزوم‌های خونی مانند آگزوزوم‌های لنفوسیتهی همچنان بررسی نشده باقی مانده‌اند و نیاز است تا در تحقیقات آینده به اثرات آنها پرداخته شود.

References

1. Lv H, Liu H, Sun T, Wang H, Zhang X, Xu W. Exosome derived from stem cell: A promising therapeutics for wound healing. *Front Pharmacol*. 2022;13:957771.
2. George Broughton II, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7S):1e-S.
3. Mester A, Opincariu D, Benedek I, Benedek I. Stem cell therapy in wound healing. *Journal of interdisciplinary medicine*. 2017;2(s4):20-4.
4. Oneto P, Etulain J. PRP in wound healing applications. *Platelets*. 2021;32(2):189-99.
5. Duscher D, Barrera J, Wong VW, Maan ZN, Whittam AJ, Januszyk M, et al. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini-review. *Gerontology*. 2016;62(2):216-25.
6. Wong VW, Sorkin M, Gurtner GC. Enabling stem cell therapies for tissue repair: current and future challenges. *Biotechnol Adv*. 2013;31(5):744-51.
7. Shi A, Li J, Qiu X, Sabbah M, Boroumand S, Huang TCT, et al. TGF- β loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. *Theranostics*. 2021;11(13):6616.
8. Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4684.
9. Rani S, Ritter T. The exosome-A naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Advanced materials*. 2016;28(27):5542-52.
10. Roefs MT, Sluijter JPG, Vader P. Extracellular vesicle-associated proteins in tissue repair. *Trends Cell Biol*. 2020;30(12):990-1013.
11. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
12. Yue B, Yang H, Wang J, Ru W, Wu J, Huang Y, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Prolif*. 2020;53(7):e12857.
13. Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4684.
14. Hettich BF, Ben-Yehuda Greenwald M, Werner S, Leroux J. Exosomes for wound healing: purification optimization and identification of bioactive components. *Advanced Science*. 2020;7(23):2002596.
15. Golchin A, Hosseinzadeh S, Ardeshiryajimi A. The exosomes released from different cell types and their effects in wound healing. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):5043-52.
16. Stunova A, Vistejnova L. Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;39:137-50.
17. Danesh A, Inglis HC, Jackman RP, Wu S, Deng X, Muench MO, et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014;123(5):687-96.
18. Bagido RA, Alzahrani M, Arif M. White blood cell types classification using deep learning models. *International Journal of Computer Science & Network Security*. 2021;21(9):223-9.
19. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):153.
20. Johnson J, Law SQK, Shojaee M, Hall AS, Bhuiyan S, Lim MBL, et al. First-in-human clinical trial of allogeneic, platelet-derived extracellular vesicles as a potential therapeutic for delayed wound healing. *J Extracell Vesicles*. 2023;12(7):12332.
21. Hao PC, Burnouf T, Chiang CW, Jheng PR, Szunerits S, Yang JC, et al. Enhanced diabetic wound healing using platelet-derived extracellular vesicles and reduced graphene oxide in polymer-coordinated hydrogels. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):318.

22. Lovisolo F, Carton F, Gino S, Migliario M, Renò F. Platelet rich plasma-derived microvesicles increased in vitro wound healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18):9658-64.
23. Verma R, Kumar S, Garg P, Verma YK. Platelet-rich plasma: a comparative and economical therapy for wound healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Bank*. 2023;24(2):285-306.
24. Bakadia BM, Ahmed AAQ, Lamboni L, Shi Z, Mukole BM, Zheng R, et al. Engineering homologous platelet-rich plasma, platelet-rich plasma-derived exosomes, and mesenchymal stem cell-derived exosomes-based dual-crosslinked hydrogels as bioactive diabetic wound dressings. *Bioact Mater*. 2023;28:74-94.
25. Guo SC, Tao SC, Yin WJ, Qi X, Yuan T, Zhang CQ. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. *Theranostics*. 2017;7(1):81.
26. Shan X, Zhang C, Mai C, Hu X, Cheng N, Chen W, et al. The biogenesis, biological functions, and applications of macrophage-derived exosomes. *Front Mol Biosci*. 2021;8:715461.
27. Wang S, Yang Y, Li S, Chen H, Zhao Y, Mu J. Recent advances in macrophage-derived exosomes as delivery vehicles. *Nano TransMed*. 2022;1(2-4):e9130013.
28. Song Y, Hu J, Ma C, Liu H, Li Z, Yang Y. Macrophage-Derived Exosomes as Advanced Therapeutics for Inflammation: Current Progress and Future Perspectives. *Int J Nanomedicine*. 2024;1597-627.
29. Lyu L, Cai Y, Zhang G, Jing Z, Liang J, Zhang R, et al. Exosomes derived from M2 macrophages induce angiogenesis to promote wound healing. *Front Mol Biosci*. 2022;9:1008802.
30. Li M, Wang T, Tian HE, Wei G, Zhao L, Shi Y. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):3793-803.
31. Kim H, Wang SY, Kwak G, Yang Y, Kwon IC, Kim SH. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing. *Advanced science*. 2019;6(20):1900513.
32. Zeng J, Sun Z, Zeng F, Gu C, Chen X. M2 macrophage-derived exosome-encapsulated microneedles with mild photothermal therapy for accelerated diabetic wound healing. *Mater Today Bio*. 2023;20:100649.
33. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa Mc. Curcumin and health. *Molecules*. 2016;21(3):264.
34. Li D, Zhang C, Gao Z, Xia N, Wu C, Liu C, et al. Curcumin-loaded macrophage-derived exosomes effectively improve wound healing. *Mol Pharm*. 2023;20(9):4453-67.
35. Kuo WP, Tigges JC, Toxavidis V, Ghiran I. Red blood cells: a source of extracellular vesicles. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. 2017;15-22.
36. Huang H, Zhu J, Fan L, Lin Q, Fu D, Wei B, et al. MicroRNA profiling of exosomes derived from red blood cell units: implications in transfusion-related immunomodulation. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
37. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-58.
38. Danesh A, Inglis HC, Jackman RP, Wu S, Deng X, Muench MO, et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014;123(5):687-96.
39. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
40. Hazrati A, Soudi S, Malekpour K, Mahmoudi M, Rahimi A, Hashemi SM, et al. Immune cells-derived exosomes function as a double-edged sword: role in disease progression and their therapeutic applications. *Biomark Res*. 2022;10(1):30.

41. Zhang Y, Cai Z, Shen Y, Lu Q, Gao W, Zhong X, et al. Hydrogel-load exosomes derived from dendritic cells improve cardiac function via Treg cells and the polarization of macrophages following myocardial infarction. *J Nanobiotechnology*. 2021;19:1-16.
42. Liu H, Gao W, Yuan J, Wu C, Yao K, Zhang L, et al. Exosomes derived from dendritic cells improve cardiac function via activation of CD4+ T lymphocytes after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:123-33.
43. Timár CI, Lőrincz ÁM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(3):510-8.
44. Yu Y, Jin H, Li L, Zhang X, Zheng C, Gao X, et al. An injectable, activated neutrophil-derived exosome mimetics/extracellular matrix hybrid hydrogel with antibacterial activity and wound healing promotion effect for diabetic wound therapy. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):308.
45. Wu R, Gao W, Yao K, Ge J. Roles of exosomes derived from immune cells in cardiovascular diseases. *Front Immunol*. 2019;10:648.