



Optimization of Platelet-Derived Exosome Isolation Using Multiple Centrifugation Steps Based on Polymer-precipitation

Mobina Nazari¹, Mahshid Mohammadipour¹ , Seyyede Fatemeh Shams^{2,3} , Mahsa Salehi¹

¹Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Hematology and Blood Banking Department, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³Cancer Molecular Pathology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran



Received: 2026/06/03
Accepted: 2026/08/05

<http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.1>

Citation:

Nazari M, Mohammadipour M, Shams F, Salehi M. Optimization of Platelet-Derived Exosome Isolation Using Multiple Centrifugation Steps Based on Polymer-precipitation. J Iran Blood Transfus. 2026; 23 (2):

Correspondence: Mohammadipour M., Assistant Professor of Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 88629445

E-mail:
m.mohammadipour@tmi.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

Exosomes are a subclass of extracellular vesicles (EVs) released via the endosomal pathway, ranging in diameter from 30 to 150 nm. They carry a diverse of biological macromolecules such as DNA, RNA, and proteins. Platelet-derived exosomes are the most abundant nanoparticles in the bloodstream. Given the need for simple and efficient isolating techniques, this study evaluates a method based on polymer precipitation for exosome isolation.

Materials and Methods

This experimental interventional study utilized platelet concentrate samples prepared by the platelet-rich plasma method, obtained from the Iranian Blood Transfusion Organization after one day after collection. On day three of storage, two different protocols differing in centrifugation steps and based on polymer precipitation were used to isolate platelet exosomes. The size of the isolated particles was compared by dynamic light scattering (DLS) (n=2). Additionally, the concentration of the isolated particles was determined using the Bradford assay (n=2), and Western blot analysis was performed for presence of the exosomal marker CD63.

Results

DLS analysis showed that Protocol A produced particles with a broader size distribution, with over 73% of particles exceeding the accepted exosome size range (>150 nm). In contrast, Protocol B which included multiple consecutive centrifugation steps, 100% of particles were within the 30-150 nm range, demonstrating more uniform size distribution. Bradford assay results showed that the average protein concentration of the extracted nanoparticles was 0.424±0.12 mg/mL for protocol A compared to 2.62±0.19 mg/ml for protocol B. Western blot analysis confirmed the expression of exosomal marker CD63 in the isolated particles.

Conclusions

Our findings demonstrate that performing multiple consecutive centrifugation steps into the polymer-precipitation method significantly enhances the purity and size of isolated platelet exosomes. This study introduces an optimized protocol for isolating high-quality exosomes based on polymer-precipitation.

Keywords: Extracellular Vesicles, Exosomes, Platelets, Dynamic Light Scattering



Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.



بهینه‌سازی جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از پلاکت با استفاده از سانتریفیوژ متوالی در روش رسوب‌دهی با پلیمر

مبینا نظری^۱، مهشید محمدی‌پور^۲، سیده فاطمه شمس^۳، مهسا صالحی^۴ ID

- ۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- دکترای تخصصی (PhD) ژنتیک مولکولی - استادیار مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- دکترای تخصصی (PhD) خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دپارتمان خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران
- ۴- مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی سرطان - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران
- ۵- دکترای تخصصی (PhD) زیست فناوری پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف

اگزوزوم‌ها دسته‌ای از وزیکول‌های خارج سلولی هستند که از طریق مسیر اندوزومال آزاد می‌شوند و قطری بین ۱۵۰-۳۰۰ نانومتر دارند. محتوای آن‌ها شامل ماکرومولکول‌های زیستی از جمله DNA، RNA و پروتئین‌ها می‌باشد. اگزوزوم‌های مشتق از پلاکت، فراوان‌ترین نانوذرات جریان خون هستند. از آن‌جا که یافتن روشی ساده و کارآمد برای جداسازی این وزیکول‌ها بسیار با اهمیت است، در این پژوهش روش مؤثری بر مبنای رسوب پلیمری جهت جداسازی اگزوزوم‌های پلاکتی معرفی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، نمونه‌های کنسانتره پلاکتی تهیه شده به روش پلاسما غنی از پلاکت پس از یک روز ذخیره‌سازی، از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. در پایان روز ۳، دو دستورالعمل مختلف در دوره‌های سانتریفیوژ و بر مبنای رسوب پلیمری، جهت جداسازی اگزوزوم‌های پلاکتی استفاده شد. اندازه ذرات جدا شده توسط تفرق دینامیکی نور یا DLS مقایسه شد ($n=2$). همچنین غلظت ذرات جدا شده با روش بردفورد تعیین شد ($n=2$) و آنالیز وسترن بلات برای نشانگر اگزوزومی CD63 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تحلیل DLS نشان داد که در دستورالعمل A، ذرات جدا شده دارای توزیع اندازه گسترده‌تری بودند و بیش از ۷۳٪ ذرات در محدوده خارج از اندازه اگزوزوم (بزرگتر از ۱۵۰ نانومتر) قرار داشتند. در مقابل، در دستورالعمل B که شامل مراحل سانتریفیوژ در چند دور متوالی و رو به افزایش بود، ۱۰۰٪ ذرات در بازه اندازه ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر (محدوده اگزوزوم) قرار گرفتند و توزیع اندازه بسیار یکنواخت‌تری مشاهده شد. همچنین، نتایج روش بردفورد نشان‌دهنده میانگین غلظت پروتئین ذرات استخراج شده، معادل 0.424 ± 0.12 در دستورالعمل A و 2.62 ± 0.19 در دستورالعمل B بود. تجزیه و تحلیل وسترن بلات نیز بیان پروتئین نشانگر اگزوزومی CD63 را در ذرات جدا شده تأیید کرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که انجام چند مرحله سانتریفیوژ متوالی در روش رسوب پلیمری، نقش مؤثری در جداسازی اگزوزوم‌های خالص‌تر با اندازه یکنواخت دارد. این مطالعه روش بهینه شده‌ای را جهت جداسازی اگزوزوم‌های خالص‌تر بر مبنای رسوب پلیمری معرفی می‌کند.

کلمات کلیدی: وزیکول‌های خارج سلولی، اگزوزوم‌ها، پلاکت‌ها، تفرق دینامیکی نور



تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۱۴

doi: <http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.1>

Citation:

Nazari M, Mohammadipour M, Shams F, Salehi M. Optimization of Platelet-Derived Exosome Isolation Using Multiple Centrifugation Steps Based on Polymer-precipitation. J Iran Blood Transfus. 2026; 23 (2):

نویسنده مسئول:

دکتر مهشید محمدی‌پور، استادیار مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

E-mail: m.mohammadipoor@tmi.ac.ir

کد اخلاق:

IR.TMI.REC.1403.018

مقدمه

وزیکول‌های خارج سلولی (EVs)، ذرات کوچکی هستند که توسط سلول‌ها آزاد می‌شوند و واسطه اصلی ارتباط سلول به سلول می‌باشند. EVها با انتقال مولکول‌های زیستی، عملکرد سلول‌های گیرنده را تنظیم می‌کنند و می‌توان آن‌ها را بر اساس ویژگی‌های بیولوژیکی، به زیرگروه‌های متعددی تقسیم کرد: اگزوزوم‌ها، میکرووزیکول‌ها و اجسام آپوپتوزی (۱). اگزوزوم‌ها قطری بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر دارند، از طریق مسیرهای اندوزومی از اجسام چند وزیکولی (MVB) منشأ می‌گیرند و از طریق فرآیند اگزوسیتوز وارد محیط خارج سلولی می‌شوند؛ آن‌ها هم چنین دارای نشانگرهای سطحی مانند تتراسپنین‌ها (CD9، CD63 و CD81)، Alix و TSG101 هستند که با کمک روش وسترن بلات برای تأیید ماهیت اگزوزوم‌ها شناسایی می‌شوند (۶-۲). تحقیقات نشان داده است که اگزوزوم‌ها واسطه‌های مولکولی مهمی برای انتقال لیپیدها، پروتئین‌ها، mRNA، miRNA، lncRNA و DNA هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهند هموستاز سلولی را حفظ کنند، زباله‌های سلولی را حذف کنند و ارتباطات بین سلولی و بین اندامی را تسهیل کنند. اگزوزوم‌ها در تمام مایعات بدن گردش می‌کنند و پیام‌های مولکولی را به روش اتوکراین و پاراکراین حمل می‌کنند (۸، ۷).

از نظر بالینی، اگزوزوم‌ها به عنوان کاندیداهای ایده‌آل برای کاربردهای مربوط به توسعه نشانگرهای زیستی و تشخیص زود هنگام بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شوند. اگزوزوم‌ها باید بر اساس اندازه، خواص بیوشیمیایی و نشانگرهای سطحی، از اجزای غیر اگزوزومی به مقدار و خلوص کافی جدا شوند (۹، ۱۰). اگزوزوم‌ها در مایعات مختلف بدن ظاهر می‌شوند، از جمله شیر مادر، مایع مغزی نخاعی، ادرار، خون، مایع آمنیوتیک، صفرا، لنف و بزاق (۱۱). بیش از ۷۵٪ از EVها، از جمله اگزوزوم‌ها، در خون از پلاکت‌ها مشتق می‌شوند (۱۲، ۱۳). تشخیص اگزوزوم‌ها از سایر انواع EVها، مانند میکرووزیکول‌ها که توسط ریزش غشای پلازما آزاد می‌شوند، از نظر تجربی چالش برانگیز است (۱۴). به دلیل اندازه نانومقیاس، خواص ناهمگن گسترده و دسترسی محدود در نمونه‌های مایعات بدن، جداسازی مؤثر و قابل اعتماد اگزوزوم‌های خالص هم‌چنان چالش برانگیز است. بنابراین، تحقیقات بیشتری باید در مورد روش‌های جداسازی اگزوزوم انجام شود (۱۵).

تحقیقات در مورد فناوری‌های مختلف جداسازی اگزوزوم در دهه‌های اخیر به یک موضوع جذاب تبدیل شده است. این

فناوری‌ها را می‌توان به طور گسترده بر اساس اصول اساسی جداسازی، مانند اولتراسانتریفیوژ، جداسازی مبتنی بر اندازه، رسوب پلیمری، جذب ایمونوافینیستی و جداسازی میکرو-فلوئیدیک طبقه‌بندی کرد (۱۶). با افزایش پتانسیل استفاده بالینی از اگزوزوم‌ها، بهینه‌سازی روش جداسازی آن‌ها برای حداکثر بازده، خلوص و تکرارپذیری سنجش ضروری شده است (۱۷).

از آن جایی که خالص‌سازی از طریق اولتراسانتریفیوژ روشی گران قیمت برای کاربردهای عملی تلقی می‌شود، استخراج اگزوزوم با استفاده از یک سری سانتریفیوژ و خالص‌سازی با پلیمر به عنوان روشی مقرون به صرفه‌تر معرفی شده است (۱۸). رسوب مبتنی بر پلیمر، یک استراتژی رایج در کیت‌های جداسازی اگزوزوم تجاری است. در میان پلیمرهای آب‌دوست مختلف، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) به طور گسترده به عنوان معرف رسوب استفاده می‌شود. PEG آب‌دوست می‌تواند با مولکول‌های آب اطراف اگزوزوم‌ها تعامل داشته و منجر به ایجاد یک ریزمحیط آبگریز شود. در طول این فرآیند، حلالیت اگزوزوم‌ها کاهش می‌یابد و اگزوزوم‌ها تحت سانتریفیوژ با دوره‌های پایین‌تر رسوب می‌کنند (۱۹).

روش جداسازی مبتنی بر رسوب نیازی به تجهیزات تخصصی ندارد، سریع، ساده و مقرون به صرفه است و فقط به حجم نمونه کمی نیاز دارد و به EVها آسیبی نمی‌رساند (۲۰). با این حال، PEG خطر اضافه شدن ناخالصی‌ها به اگزوزوم‌های استخراج شده را دارد که ممکن است در فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها اختلال ایجاد کند. هم‌چنین رسوب هم‌زمان میکرووزیکول‌ها، از معایب رسوب‌گذاری است (۲۱).

کاستی‌های رسوب اگزوزوم مبتنی بر PEG را می‌توان با ترکیب با سایر روش‌ها برطرف کرد. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که ترکیب PEG و سایر روش‌ها، از جمله اولتراسانتریفیوژ، به طور بالقوه اگزوزوم‌ها را در محدوده قطر مطلوب قرار می‌دهد (۲۲). هدف از طراحی این مطالعه، بررسی اثر سانتریفیوژ در چند دور متوالی و رو به افزایش بر سائز اگزوزوم‌های پلاکتی جدا شده بر اساس رسوب پلیمری است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه دو روش جداسازی بر مبنای رسوب پلیمری با یکدیگر مقایسه شدند. این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود و سه نمونه کنسانتره پلاکتی تهیه شده در کیسه فرآورده پلاکتی (همونتیکس، آمریکا) و به روش پلاسمای غنی از

تعیین غلظت پروتئین در اگزوزوم‌ها با استفاده از روش بردفورد:

برای تعیین غلظت، از استاندارد BSA (Bovine serum albumin) با غلظت‌های مشخص ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. بدین منظور ۲۰۰ μL از معرف بردفورد (بایورد، آمریکا) در چاهک‌ها ریخته شد و متعاقب آن ۱۰ μL از رقت‌های استاندارد تهیه شده و اگزوزوم‌های جدا شده به چاهک‌ها اضافه شد و نهایتاً جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (۲۵). لازم به ذکر است که تست دو بار تکرار شد ($n=2$) استانداردهای تهیه شده و نمونه‌ها، به صورت سه تایی (triplicate) مورد آزمایش قرار گرفتند.

تعیین اندازه اگزوزوم‌ها با استفاده از روش تفرق دینامیکی نور (DLS):

یکی از روش‌های تجزیه و تحلیل نانو ذرات، روش سنجش تفرق دینامیکی نور (DLS) است که توانایی اندازه‌گیری ذرات در داخل محلول را به صورت سریع، ساده و بدون نیاز به آماده‌سازی نمونه دارد. این روش برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. در این روش، یک پرتو لیزر به سوسپانسیون ذرات تابیده شده و تغییرات وابسته به زمان در شدت نور پراکنده شده، که ناشی از حرکت براونی ذرات در محیط است و توسط یک آشکارساز ثبت می‌گردد. نهایتاً، میانگین اندازه هیدرودینامیکی ذرات محاسبه می‌شود (۲۶). اگزوزوم‌های استخراج شده به کمک PBS به حجم ۲۰۰۰ μL رسانده شد و با دستگاه نانوپارتیکل آنالایزر (مدل SZ-100_ هوربا سایننتیفیک- ژاپن) خوانده و تجزیه و تحلیل گردید. آزمایش دو بار تکرار شد ($n=2$) و نمونه‌ها به صورت سه تایی (triplicate) مورد آزمایش قرار گرفتند. این مرحله در آزمایشگاه مرکزی دانشکده شیمی دانشگاه تهران انجام شد.

تعیین ماهیت اگزوزوم‌ها با استفاده از روش لکه‌گذاری وسترن:

برای تأیید هویت ذرات جدا شده، وسترن بلات برای نشانگر CD63 که یکی از نشانگرهای اختصاصی اگزوزوم‌ها است، انجام شد (۱۳). ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نمونه به همراه بافر نمونه (۵x) به مدت ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و سپس نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل آمید SDS PAGE ۱۰٪ برای جداسازی پروتئین‌های با وزن

پلاکت (PRP) مورد استفاده قرار گرفت. پلاکت‌ها پس از یک روز ذخیره‌سازی و به صورت تصادفی از فرآورده‌های پلاکتی سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. در مورد گروه خونی، حجم و شکل ظاهری کیسه‌ها هیچ انتخابی وجود نداشت. میانگین تعداد پلاکت‌ها در کنسانتره پلاکتی معادل $1.06 \times 10^6 / \mu\text{L}$ بوده است. کنسانتره‌های پلاکتی پس از دو روز قرارگرفتن داخل انکوباتور شیکردار (شرکت دانش پژوهش فجر، ایران) در دمای ۲۰ الی ۲۴ درجه سانتی‌گراد pooled شدند و جهت جداسازی اگزوزوم‌های پلاکتی، مورد استفاده قرار گرفتند. اگزوزوم‌ها طی فعالیت طبیعی پلاکت‌ها طی سه روز آزاد و در کیسه‌های پلاکتی انباشته شدند (۲۳). نمونه‌گیری از کیسه‌های پلاکتی در شرایط استریل و زیر هود لامینار کلاس دو (بعثت، ایران) صورت گرفت.

تهیه اگزوزوم‌های پلاکتی با دو دستورالعمل مختلف براساس رسوب پلیمری با استفاده از کیت تجاری (آناتپ، ایران): در ابتدا به منظور فعال‌سازی، پلاکت‌ها، بعد از اضافه کردن CaCl_2 با غلظت نهایی ۲۲ mM به ۱۰ سی‌سی PRP، یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس؛

در پروتکل A، طبق پروتکل پیشنهادی کیت PRP با دور ۳۰۰۰ g به منظور حذف پلاکت و بقایای سلولی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی بعد از جمع‌آوری با فیلتر $0.22 \mu\text{M}$ (اورنج، انگلستان) فیلتر شد.

در پروتکل B، به منظور بهینه‌سازی روش پیشنهادی کیت، سانتریفیوژ در چند دور متوالی و رو به افزایش انجام شد. پلاکت‌ها پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ رسوب کرده و به منظور حذف بقایای سلولی، سوپ رویی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت، جهت حذف ذرات بزرگ سوپ رویی به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد (۲۴). لازم به ذکر است تمام مراحل با سانتریفیوژ یخچال‌دار (هرمل، آلمان) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سوپ رویی بعد از جمع‌آوری با فیلتر $0.22 \mu\text{M}$ (اورنج، انگلستان) فیلتر شد.

در هر دو پروتکل بعد از فیلتراسیون، محلول A کیت (بر پایه PEG) به نسبت ۱ به ۵ (نمونه) اضافه شد. بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون طبق پروتکل کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با دور ۳۰۰۰ g به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده در ۲۰۰ μL بافر PBS به حالت سوسپانسیون در آمد.

Square و نرم افزار Graph Pad Prism ۸ استفاده شد. خطای آلفای ۵ درصد ($p < 0.05$) به عنوان مرز رد یا تأیید فرض صفر در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

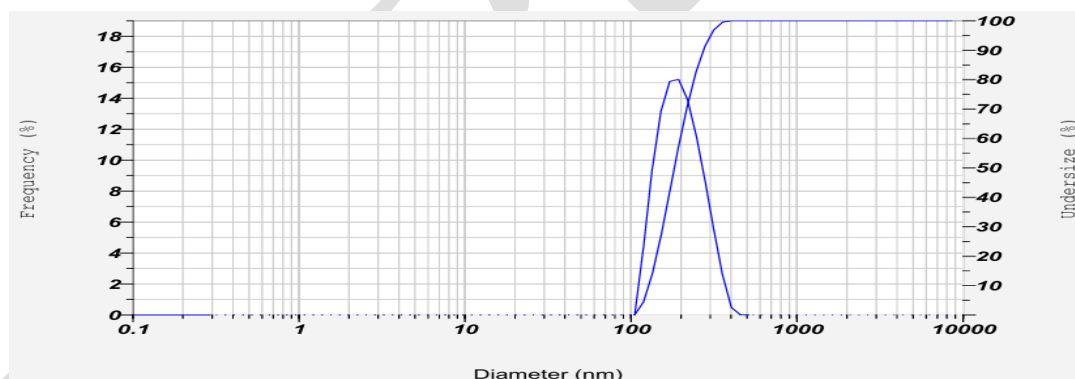
بررسی اندازه ذرات جداسازی شده با DLS:

میانگین قطر ذرات جداسازی شده با پروتکل A و B به ترتیب $451/37 \pm 132/78$ nm و $58/80 \pm 3/46$ nm بود (شکل ۱). فراوانی ذرات جدا شده و توزیع اندازه ذرات نیز نشان داده شده است (جدول ۱) (نمودار ۱). همان طور که در نمودار پروتکل A مشاهده می‌شود، این پروتکل منجر به تولید ذراتی با توزیع اندازه نسبتاً گسترده‌تری شده و محدوده کلی ذرات تا بیش از ۴۰۰ نانومتر گسترده است. در مقابل، نتایج حاصل از پروتکل B توزیع اندازه بسیار باریک‌تر و یکنواخت‌تری را نشان می‌دهد. هم چنین دامنه پراکندگی ذرات در این روش بسیار محدودتر بوده و بیشتر ذرات در بازه ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر در محدوده سائز اگزوزوم‌ها قرار می‌گیرد.

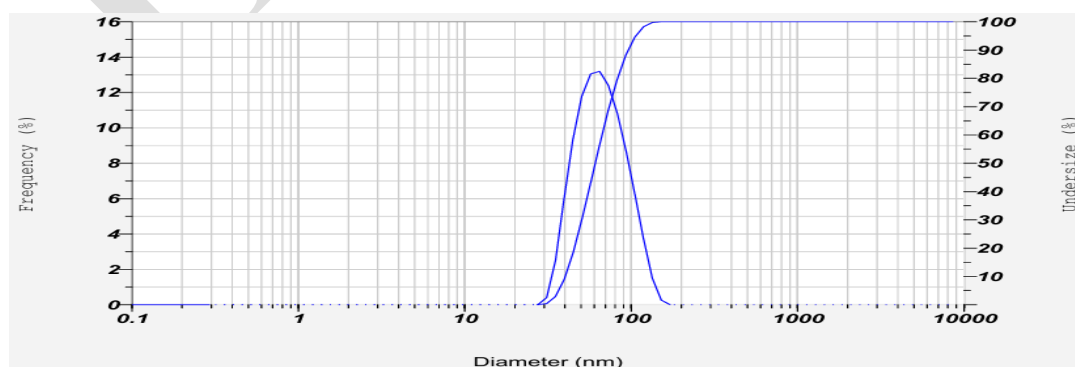
مولکولی مختلف قرار داده شدند. در یکی از چاهک‌های ژل، پروتئین سائز مارکر (سایتومتین ژن، ایران) برای تعیین سائز باندهای پروتئینی افزوده شد. باندها به مدت یک شب با ولتاژ ۳۰ ولت به غشای PVDF (روش، سوئیس) منتقل شدند، سپس غشاء در محلول شیر خشک ۵٪ فاقد چربی مسدود شد. در مرحله بعد، غشاء با آنتی‌بادی CD63 (پادزادتن، ایران) در ۴ درجه سانتی‌گراد در طول شب انکوبه شد. غشاء سه بار با محلول PBS حاوی ۰.۰۵٪ توئین ۲۰ (مرک، آلمان) شسته شد و سپس به مدت ۳ ساعت در شرایط تاریکی با آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با آنزیم Horseradish Peroxidase (Anti-mouse IgG) (HRP) (سایتومتین، ایران) انکوبه شد. متعاقباً، غشاء با محلول PBS حاوی ۰.۰۵٪ توئین ۲۰ شسته شد. برای آشکارسازی باند پروتئینی از سوبسترای ECL (سایتومتین، ایران) استفاده شد. با استفاده از سیستم تصویربرداری مولکولی (بایورد، آمریکا) تصاویر از غشاء تهیه شد.

آنالیز آماری:

جهت آنالیز آماری فرضیه این پژوهش از آزمون Chi-



پروتکل A



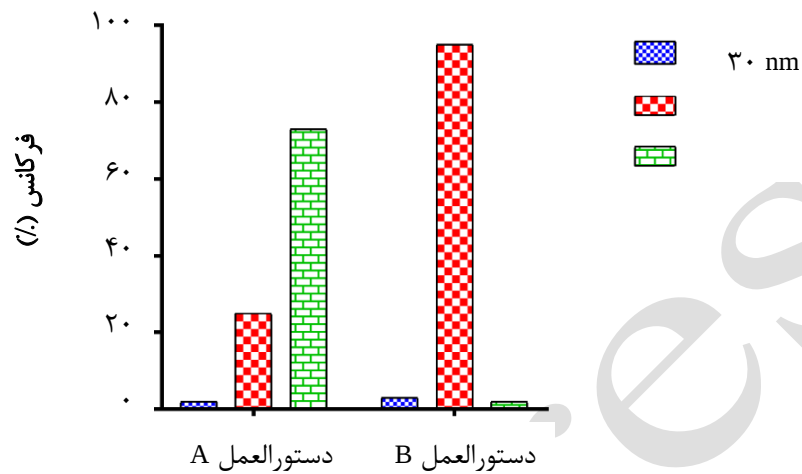
پروتکل B

شکل ۱: بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS). سائز و درصد فراوانی ذرات جداسازی شده توسط روش A و B قابل مشاهده است.

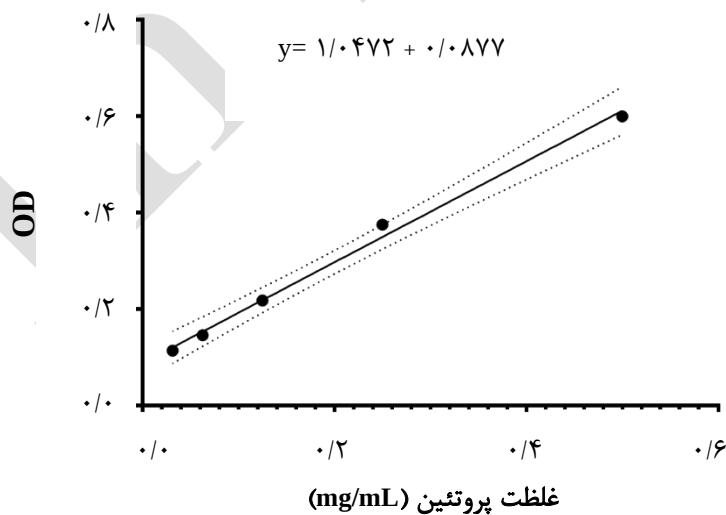
جدول ۱: فراوانی ذرات جدا شده بر اساس سایز

p-value	χ^2	>۱۵۰ nm (درصد)	۳۰-۱۵۰ nm (درصد)	<۳۰ nm درصد	
< ۰/۰۰۰۱	۱۰۸/۲۴	۷۳ (۷۳/۰)	۲۵ (۲۵/۰)	۲ (۲/۰)	پروتکل A
		۲ (۲/۰)	۹۵ (۹۵/۰)	۳ (۳/۰)	پروتکل B

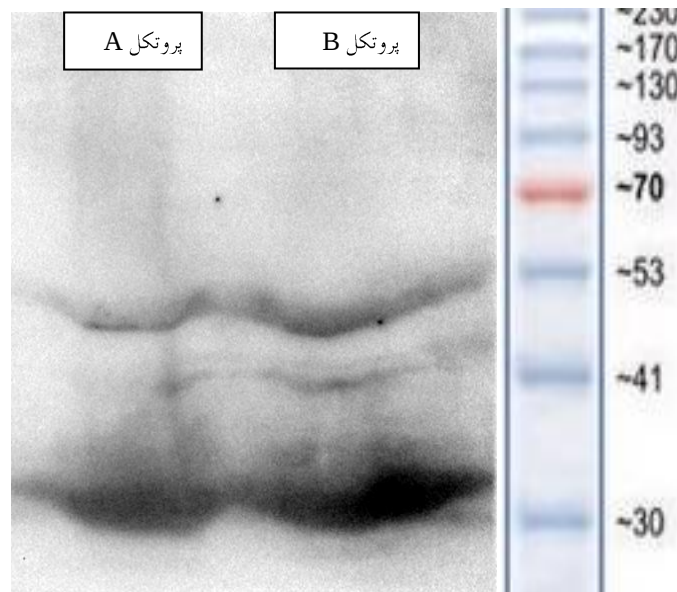
$$p < ۰/۰۰۰۱ \quad (\chi^2 = ۱۰۸/۲۴)$$



نمودار ۱: تجزیه و تحلیل توزیع اندازه ذرات جدا شده بر اساس فراوانی



نمودار ۲: نمودار استاندارد رقت‌های محلول BSA، جذب نوری رقت‌های متفاوت محلول BSA در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. خط پر، خط رگرسیون و نقطه چین‌ها، فاصله اطمینان ۹۵ درصد از خط رگرسیون را نشان می‌دهد.



شکل ۲: نتایج ایمونواسی با آنتی‌بادی مونوکلونال CD63 به روش وسترن بلات. سه باند با وزن مولکولی متفاوت (۳۲ KDa، ۳۵ KDa و ۵۰ KDa) مشاهده شد.

روش Bradford برای تعیین غلظت آگروزوم:

به منظور ارزیابی کمی بازده استخراج ذرات در دو پروتکل A و B، در نرم افزار Excel، منحنی استاندارد رسم گردید (نمودار ۲). بر اساس نمودار جذب نمونه استاندارد BSA در غلظت‌های متفاوت، میانگین غلظت پروتئین ذرات استخراج شده در پروتکل A و B به ترتیب معادل 0.12 ± 0.424 و 0.19 ± 0.62 mg/mL تعیین گردید. نتایج نشان دهنده تفاوت قابل توجهی در میزان پروتئین استخراج شده بین دو روش بود. غلظت بالای پروتئین در پروتکل B، همسو با نتایج DLS، تأکید می‌کند که این پروتکل نه تنها از نظر سایز، بلکه احتمالاً از نظر کمی نیز روش برتری برای جداسازی آگروزوم‌ها به شمار می‌رود.

بررسی آگروزوم‌های جداسازی شده توسط آنالیز وسترن بلات:

جهت تعیین هویت ذرات جدا شده، ایمونواسی با آنتی‌بادی مونوکلونال CD63 به روش وسترن بلات انجام شد. آگروزوم‌های جداسازی شده پروتئین CD63 را بیان کردند (شکل ۲). علت مشاهده سه باند با وزن مولکولی متفاوت (۳۲ KDa، ۳۵ KDa و ۵۰ KDa) احتمالاً به دلیل گلیکوزیلاسیون پروتئین می‌باشد (۲۷).

بحث

آگروزوم‌ها پیام‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک را بین

سلول‌ها منتقل می‌کنند و خواص جذب سلولی عالی دارند. نقش آن‌ها در ارتباطات بین سلولی این فرصت را فراهم می‌کند تا به عنوان حامل‌های بیولوژیکی عمل کنند (۲۸). پر هزینه بودن تولید انبوه آگروزوم از سلول‌های انسانی و عدم دستیابی به یک روش کارآمد و به صرفه برای جداسازی آگروزوم باعث شده که آگروزوم‌ها چندان در حوزه درمان موفق عمل نکنند (۲۹). در نتیجه بهینه‌سازی روش‌های جداسازی آگروزوم می‌تواند در آینده‌ای نزدیک باعث رویکرد جدید سلول درمانی بر مبنای آگروزوم باشد.

اگر چه اولتراسانتریفیوژ رایج‌ترین روش جداسازی آگروزوم است که به عنوان روش گلد استاندارد در نظر گرفته می‌شود، اما روشی پر هزینه است که امکان دسترسی به آن را محدود می‌کند. هم‌چنین، سانتریفیوژهای متوالی و طولانی در دور بالا ممکن است به وزیکول‌های خارج سلولی آسیب برساند و ساختار آن‌ها را تغییر دهد و بر کیفیت آن‌ها تأثیر بگذارد (۳۱، ۳۰).

در روش اولتراسانتریفیوژ، دستورالعمل‌های سانتریفیوژ یکسان برای روتورهای مختلف (Swinging-Bucket Rotor، Fixed-Angle Rotor) به کار گرفته می‌شوند که اغلب باعث تفاوت داده‌ها توسط گروه‌های تحقیقاتی متفاوت می‌شود (۳۲). یکی دیگر از روش‌های جداسازی آگروزوم، بر مبنای رسوب پلیمری است که در آن، فقدان روشی برای جداسازی آگروزوم‌ها و تجمعات پروتئینی با چگالی بالا ممکن است منجر به آلودگی پلت آگروزوم با پروتئین‌های آزاد، به ویژه در

پروتکل B، ۹۵٪ ذرات در بازه ۱۵۰-۳۰ نانومتر جای گرفتند و اندازه ذرات یکنواخت شد ($p < ۰/۰۰۱$) (جدول ۱) (نمودار ۱).

جهت تعیین هویت ذرات جدا شده، نتایج وسترن بلات نشان داد که ذرات جدا شده غنی از مارکر اگزوزومی CD63 بودند (شکل ۲). تتراسپانین CD63 یک نشانگر اگزوزومی شناخته شده با سه جایگاه گلیکوزیلاسیون است.

در مطالعه‌ای گفته شد اسمیر موجود برای CD63 در نتایج وسترن بلات، نشان‌دهنده گلیکوزیلاسیون CD63 است (۳۹). نتایج وسترن بلات مطالعه حاضر سه باند در محدوده ۳۲ KDa، ۳۵ KDa و ۵۰ KDa نشان داد. همچنین نتایج مشابه در مطالعه‌ای بیان کرد CD63 به صورت لکه‌ای از باندهای بین ۲۵ تا ۶۰ کیلو دالتون ظاهر شد که به دلیل گلیکوزیلاسیون متغیر پروتئین است که می‌تواند بر مهاجرت در طول الکتروفورز تأثیر بگذارد (۴۰). در مطالعه سوسل و همکاران، پس از فعال‌سازی پلاکت‌ها با گلوکونات کلسیم، جداسازی و تعیین هویت اگزوزوم‌ها صورت گرفت. وسترن بلات پروتئین CD63 جهت تعیین هویت اگزوزوم‌های جدا شده انجام شد که در اگزوزوم‌های آزاد شده از پلاکت فعال شده، باند قوی تر را نشان داد (۲۸). شمس و همکاران بیان کردند پس از فعال‌سازی پلاکت با آگونیست‌های اپی‌نفرین و کلرید کلسیم، توزیع اندازه ذرات جدا شده فراوانی نسبی بیشتری از اگزوزوم‌ها را دارد (۴۱).

یونوفور Ca₂، یک محرک شناخته شده برای تشکیل EV صرف نظر از نوع سلولی می‌باشد. مطالعه‌های زیادی نشان دادند یونوفور کلسیم منجر به افزایش ترشح اگزوزوم از پلاکت‌ها می‌شود (۴۲). همان طور که از نتایج DLS و بردفورد مشخص است، در این مطالعه نشان داده شد که پروتکل B مقدار اگزوزوم‌های بیشتری در محدوده سایز یکنواخت‌تری را حاصل می‌کند.

نتیجه‌گیری

سانتریفیوژ در چند دور متوالی و رو به افزایش به همراه رسوب مبتنی بر پلیمر، نقش مؤثری در جداسازی اگزوزوم‌های پلاکتی دارد که می‌تواند بر ناهمگونی ذرات غلبه کرده و اگزوزوم‌هایی با سایز در محدوده یکنواخت فراهم آورد. همچنین، این روش احتمالاً به افزایش بازده کلی اگزوزوم‌های جدا شده نیز منجر می‌گردد. بر این اساس، روش پیشنهادی برای مطالعه‌های تحقیقاتی با هدف استخراج اگزوزوم‌های پلاکتی توصیه می‌شود.

نمونه‌های سرم با آلبومین فراوان، شود. در حال حاضر، نسبت ذرات به غلظت پروتئین (تعداد ذرات/ میکروگرم پروتئین) به عنوان شاخص خوبی برای خلوص ذرات پذیرفته شده است. برخی از دستورالعمل‌های رسوب‌گذاری، بالاترین بازده ذرات را تولید می‌کنند، اما نسبت ذرات به پروتئین پایینی دارند که احتمالاً به دلیل جداسازی هم‌زمان پروتئین‌ها می‌باشد (۳۳، ۳۴). همچنین، عامل رسوب‌دهنده به سختی از آماده‌سازی نهایی حذف می‌شود. با این وجود، این روش‌ها، در حال مطالعه و مقایسه با اولتراسانتریفیوژ هستند تا به یک روش جداسازی آسان‌تر تبدیل شوند (۳۵). محدودیت‌های موجود در روش‌های مختلف جداسازی اگزوزوم، بهینه‌سازی در جهت استخراج اگزوزوم‌ها را ضروری می‌سازد.

از دیگر محدودیت‌ها در روش‌های جداسازی اگزوزوم، جداسازی جمعیت‌های مجزا از وزیکول‌ها می‌باشد. در مطالعه‌ای، نتایج اولتراسانتریفیوژ جداسازی حداقل دو جمعیت مجزا از وزیکول‌ها را نشان داد که نشان می‌دهد جمعیت‌های متفاوتی از وزیکول‌ها در اگزوزوم‌های جدا شده با روش اولتراسانتریفیوژ حضور دارند (۳۶). در بین روش‌های مختلف جداسازی اگزوزوم، روش‌های رسوب‌دهی درصد بیشتری از ذرات بزرگتر را همراه با اگزوزوم جدا می‌کنند. در مطالعه‌ای، توسط ریچارد و همکاران، گفته شد کیت‌های تجاری بر مبنای رسوب پلیمری، منجر به جداسازی ذرات غیراگزوزومی شده و قادر به برطرف کردن ناهمگونی ذرات نیستند (۳۴). در مطالعه‌ای که کیم و همکارانش انجام دادند، برای جدا کردن اگزوزوم‌های مشتق از رسوب آلوده ساپونیا از روش رسوب پلیمری استفاده شد. آن‌ها در مرحله تخلیه بقایای سلولی و وزیکول‌های سلولی بزرگتر، نمونه را به مدت سه بار با سرعت سانتریفیوژی که به تدریج افزایش می‌یابد سانتریفیوژ کردند که منجر به قرار گرفتن ذرات جدا شده در محدوده اگزوزوم شد (۳۷). با توجه به چگالی کمتر اگزوزوم‌ها در مقایسه با سایر وزیکول‌های خارج سلولی، این ذرات پس از سانتریفیوژهای متوالی با سرعت پایین در فاز رویی (سوپرناتانت) باقی می‌مانند. این امر موجب می‌شود که میکرووزیکول‌ها و سایر ذرات بزرگتر طی این مراحل در پلت محبوس شده و به طور مؤثر از نمونه حذف شوند (۳۸). در پژوهش حاضر، نتایج DLS نشان داد که در پروتکل A بر مبنای رسوب‌دهی با استفاده از کیت تجاری به روش پیشنهادی شرکت سازنده، ۷۳٪ از ذرات خارج از محدوده اگزوزوم (بزرگتر از ۱۵۰ نانومتر) قرار گرفتند، در حالی که با انجام سانتریفیوژ در چند دور متوالی و رو به افزایش در

نقش نویسندگان

مبینا نظری: اجرای پژوهش، نگارش مقاله
دکتر مهشید محمدی پور: ایده پردازی و طراحی مطالعه،
همکاری و نظارت بر اجرای پژوهش و نگارش مقاله
دکتر فاطمه شمس: همکاری در اجرای پژوهش و نگارش
مقاله

دکتر مهسا صالحی: مشاور طرح

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد
مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می باشد.
بدین وسیله از حوزه معاونت آموزشی و پژوهشی مؤسسه
عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تشکر و قدردانی
می گردد.

حمایت مالی

حمایت مالی از این پروژه، توسط مؤسسه عالی آموزشی
و پژوهشی طب انتقال خون، در قالب گرنت پژوهشی استاد
راهنما تأمین شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.TMI.REC.1403.018 تأیید
شده در کار گروه اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی
مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون در مرکز
تحقیقات انتقال خون انجام شده است.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار می دارند که هیچ گونه تعارض منافی
در مطالعه حاضر وجود ندارد.

References:

- Zhou X, Huang J, Zhang D, Qian Z, Zuo X, Sun Y. Small extracellular vesicles: the origins, current status, future prospects, and applications. *Stem Cell Res Ther.* 2025;16(1):184.
- Park SH, Lee EK, Yim J, Lee MH, Lee E, Lee YS, *et al.* Exosomes: Nomenclature, Isolation, and Biological Roles in Liver Diseases. *Biomol Ther (Seoul).* 2023;31(3):253-63.
- Kar R, Dhar R, Mukherjee S, Nag S, Gorai S, Mukerjee N, *et al.* Exosome-Based Smart Drug Delivery Tool for Cancer Theranostics. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023; 9(2): 577-94.
- He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics.* 2018; 8(1): 237-55.
- Shams SF, Javan MR, Shahriyari F. The role of platelet derived exosomes in regenerative medicine. *Nanomedicine Journal.* 2025;12(1): 1-14.
- Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp.* 2012(59): e3037.
- Chen YF, Luh F, Ho YS, Yen Y. Exosomes: a review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials. *J Biomed Sci.* 2024; 31(1): 67.
- Saleem M, Shahzad KA, Marryum M, Singh S, Zhou Q, Du S, *et al.* Exosome-based therapies for inflammatory disorders: a review of recent advances. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1): 477.
- Liu Q, Li S, Dupuy A, Mai HL, Sailliet N, Logé C, *et al.* Exosomes as New Biomarkers and Drug Delivery Tools for the Prevention and Treatment of Various Diseases: Current Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(15):7763.
- Zhu L, Sun HT, Wang S, Huang SL, Zheng Y, Wang CQ, *et al.* Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):152.
- Kubaev A, Faez Sead F, Pirouzbakht M, Nazari M, Riyahi H, Sargazi Aval O, *et al.* Platelet-derived extracellular vesicles: emerging players in hemostasis and thrombosis. *J Liposome Res.* 2025; 35(3): 334-44.
- Wei K, Huang H, Liu M, Shi D, Ma X. Platelet-Derived Exosomes and Atherothrombosis. *Front Cardiovasc Med.* 2022; 9: 886132.
- Shams SF, Mohammadipour M, Deyhim MR. Platelet-derived exosomes as the nano-carrier for miR-150 to modulate gene expression and cell cycle in the M07-e cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2023;(86):104644.
- Sheta M, Taha EA, Lu Y, Eguchi T. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. *Biology (Basel).* 2023;12(1):110.
- Dilsiz N. A comprehensive review on recent advances in exosome isolation and characterization: Toward clinical applications. *Transl Oncol.* 2024; 50: 102121.
- Wang W, Sun H, Duan H, Sheng G, Tian N, Liu D, *et al.* Isolation and usage of exosomes in central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2024; 30(3):e14677.
- Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, *et al.* Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 5335.
- Suharta S, Barlian A, Hidajah AC, Notobroto HB, Ana ID, Indariani S, *et al.* Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *J Food Sci.* 2021; 86(7): 2838-50.
- Xu K, Jin Y, Li Y, Huang Y, Zhao R. Recent Progress of Exosome Isolation and Peptide Recognition-Guided Strategies for Exosome Research. *Front Chem.* 2022; 10: 844124.

- 20- Ljungström M, Oltra E. Methods for Extracellular Vesicle Isolation: Relevance for Encapsulated miRNAs in Disease Diagnosis and Treatment. *Genes (Basel)*. 2025;16(3):330.
- 21- Omrani M, Beyrampour-Basmenj H, Jahanban-Esfahlan R, Talebi M, Raeisi M, Serej ZA, *et al*. Global trend in exosome isolation and application: an update concept in management of diseases. *Mol Cell Biochem*. 2024; 479(3): 679-91.
- 22- Huang Q, Wang J, Ning H, Liu W, Han X. Exosome isolation based on polyethylene glycol (PEG): a review. *Mol Cell Biochem*. 2025; 480(5): 2847-61.
- 23- Zhang JP, Chen BB, Zheng HH, Yang HJ, Song L. Discharge and Contents of Exosome from Leukocyte-Reduced Apheresis Platelet Stored for Different Storage Time. 2019; 27(6):1993-7.[Article in Chinese]
- 24- Wei K, Yu L, Li J, Gao J, Chen L, Liu M, *et al*. Platelet-derived exosomes regulate endothelial cell inflammation and M1 macrophage polarization in coronary artery thrombosis via modulating miR-34a-5p expression. *Sci Rep*. 2024; 14(1):17429.
- 25- Rahmatinejad F, Kharat Z, Jalili H, Renani MK, Mobasheri H. Comparison of morphology, protein concentration, and size distribution of bone marrow and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells exosomes isolated by ultracentrifugation and polymer-based precipitation techniques. *Tissue Cell*. 2024; 88:102427.
- 26- Falke S, Betzel C. Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples. *Radiation in Bioanalysis*. 2019;8:173-93.
- 27- Tominaga N, Hagiwara K, Kosaka N, Honma K, Nakagama H, Ochiya T. RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. *Mol Cancer*. 2014;13:134.
- 28- Saumell-Esnaola M, Delgado D, García Del Caño G, Beitia M, Sallés J, González-Burguera I, *et al*. Isolation of Platelet-Derived Exosomes from Human Platelet-Rich Plasma: Biochemical and Morphological Characterization. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5): 2861.
- 29- Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*. 2022;16(2):115-26.
- 30- Bhujel B, Oh SH, Kim CM, Yoon YJ, Kim YJ, Chung HS, *et al*. Mesenchymal Stem Cells and Exosomes: A Novel Therapeutic Approach for Corneal Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(13): 10917.
- 31- Aliakbari F, Stoczek NB, Cole-André M, Gomes J, Fanchini G, Pasternak SH, *et al*. A methodological primer of extracellular vesicles isolation and characterization via different techniques. *Biol Methods Protoc*. 2024; 9(1): bpae009.
- 32- Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, *et al*. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*. 2015; 30: 5:17319.
- 33- Tang YT, Huang YY, Zheng L, Qin SH, Xu XP, An TX, *et al*. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med*. 2017; 40(3): 834-44.
- 34- Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegman AP, Leimgruber A, *et al*. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 27031.
- 35- Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(12): 2369-82.
- 36- Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012;16:1.
- 37- Kim M, Park JH. Isolation of Aloe saponaria-Derived Extracellular Vesicles and Investigation of Their Potential for Chronic Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2022;14(9): 1905.
- 38- Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*. 2010; 77(8): 736-42.
- 39- Kavanagh EL, Halasz M, Dowling P, Withers J, Lindsay S, Higgins MJ, *et al*. N-Linked glycosylation profiles of therapeutic induced senescent (TIS) triple negative breast cancer cells (TNBC) and their extracellular vesicle (EV) progeny. *Mol Omics*. 2021;17(1):72-85.
- 40- Tam NW, Becker A, Mangiarotti A, Cipitria A, Dimova R. Extracellular Vesicle Mobility in Collagen I Hydrogels Is Influenced by Matrix-Binding Integrins. *ACS Nano*. 2024; 18(43): 29585-601.
- 41- Shams SF, Mohammadipour M, Deyhim MR. Preparation and characterization of platelet-derived exosomes, as a nanostructure for bio-compound delivery. *Nanomedicine Journal*. 2023; 10(2): 131-7.
- 42- Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014; 6:3.

