

Milk-derived exosomes: optimized extraction strategies, proteomic characterization, stability, and biomedical applications

Amin Abbasi^{1,2} , Hadi Ghanbari³ , Mohammadali Torbati¹ , Parmis Mirzaei⁴ , Leili Aghebati-Maleki^{2,*} 

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Department of Clinical Nutrition and Dietetics, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 23 May 2026

Revised: 15 Aug 2026

Accepted: 17 Aug 2026

ePublished: 5 Sep 2026

Keywords:

- Milk-derived exosomes
- Sources
- Isolation approaches
- Proteomics
- Stability
- Biopharmaceutical applications

Abstract

Background. Exosomes are nanoscale vesicles that play a pivotal role in intercellular communication. Among various biological fluids, mammalian milk has emerged as an ideal source due to its safety, wide availability, and cost-effectiveness. Despite significant growth in this field, current evidence remains fragmented due to heterogeneity in biological sources, isolation protocols, purity standards, and stability assessment criteria. This critical review addresses this research gap by providing a systematic comparison of various milk sources and isolation methods with evaluating purity, yield, proteomic profiles, stability, and translational applicability and thereby elucidating the biomedical potential of these nanovesicles.

Methods. In this critical review, relevant data were gathered by searching key terms (milk-derived exosomes, sources, extraction approaches, proteomics, stability, and biopharmaceutical applications) across the Web of Science, PubMed, Medline, and Scopus databases, covering literature from inception up to July 2026. All source materials associated with empirical studies were included in the analysis, whereas publications lacking accessible full texts were excluded.

Results. The reviewed studies indicate that milk-derived exosomes are capable of crossing biological barriers, entering target cells, and delivering molecular cargos including proteins, mRNA, miRNA, and lipids, thereby modulating recipient cell functions. Contaminants were shown to significantly affect exosome purity, highlighting the need for reproducible isolation techniques such as differential centrifugation, density-gradient ultracentrifugation, size-exclusion chromatography, and ExoQuick precipitation. LC-MS/MS-based proteomic analyses have enabled precise characterization of exosomal components and deeper insight into their biogenesis and functional roles. Evidence also demonstrates that milk-derived exosomes exhibit considerable stability under various temperature conditions and in simulated gastrointestinal environments, effectively protecting their cargos. Moreover, preclinical studies emphasize their bioactive properties, therapeutic delivery potential, and utility as non-invasive biomarkers for disease diagnosis.

Conclusion. Milk-derived exosomes represent a promising platform for biomedical applications and advanced drug delivery systems owing to their biological stability, efficient molecular cargo transport capacity, and high biocompatibility. Nevertheless, standardization of isolation procedures and further clinical evaluations are essential to fully realize their therapeutic potential.

*Corresponding author; Email: aghebatil@tbzmed.ac.ir

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Practical Implications. Milk-derived exosomes can serve as safe and naturally biocompatible nanocarriers for drug and gene delivery. Their stability and ability to cross biological barriers make them promising candidates for the development of novel therapeutic systems, functional foods, and non-invasive diagnostic biomarkers.

How to cite this article: Abbasi A, Ghanbari H, Torbati M, Mirzaei P, Aghebati-Maleki L. Milk-derived exosomes: optimized extraction strategies, proteomic characterization, stability, and biomedical applications. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(4):314-338. doi: 10.34172/mj.026.35395. Persian.

Extended Abstract

Background

Milk-derived exosomes have emerged as a highly promising class of natural nanovesicles with significant potential in biomedical research and translational applications. These vesicles are released by mammalian milk and participate in intercellular communication through the transport of proteins, lipids, mRNA, and microRNA. Their biological relevance, together with milk's inherent safety, accessibility, and large-scale availability, has positioned milk as an attractive source for exosome isolation. However, despite rapid growth in this field, the literature remains fragmented because of substantial variation in milk species, isolation strategies, purification levels, analytical methods, and stability assessment criteria. These inconsistencies limit comparability across studies and hinder clinical translation. The present review addresses these gaps by critically evaluating milk-derived exosome isolation approaches, proteomic composition, physicochemical stability, and reported biomedical functions, with emphasis on methodological robustness and translational potential.

Methods

This review was designed as a structured analytical synthesis of published evidence on milk-derived exosomes. A comprehensive literature search was conducted across major scientific databases, including PubMed/MEDLINE, Scopus, and Web of Science, using combinations of keywords related to milk origin, exosome isolation, purification, characterization, proteomics, and biomedical application. Studies were considered eligible if they reported original data on milk-derived exosomes from human or non-human mammalian sources and

provided sufficient methodological detail on extraction, purification, characterization, or functional evaluation. Both classical and advanced isolation strategies were examined, including differential centrifugation, ultracentrifugation, density-gradient ultracentrifugation, size-exclusion chromatography, and commercial precipitation-based approaches. The review further assessed characterization techniques such as transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering, western blotting, and LC-MS/MS proteomics. Particular attention was given to studies that compared yield, purity, structural integrity, and preservation of biological activity across protocols and species. Evidence related to thermal stability, gastrointestinal resistance, cellular uptake, and in vivo bioactivity was also extracted and synthesized to identify reproducible patterns and methodological limitations.

Results

The reviewed evidence demonstrates that milk-derived exosomes are structurally and functionally distinct nano-sized vesicles with broad biomedical relevance. A major finding is that the source of milk and the extraction method markedly influence vesicle yield, purity, and downstream functionality. Differential centrifugation remains the most widely used initial isolation method because of its accessibility and compatibility with large sample volumes; however, it is labor-intensive and often co-isolates casein micelles, protein aggregates, and lipid contaminants. Density-gradient ultracentrifugation generally provides higher purity but requires specialized equipment, extended processing time, and substantial technical expertise. In contrast, size-

exclusion chromatography has gained attention for producing cleaner exosome fractions while better preserving membrane integrity and functional cargo. Commercial precipitation kits offer convenience and speed but often compromise purity and are therefore less suitable for studies requiring rigorous molecular characterization. Proteomic analyses using LC-MS/MS have revealed that milk exosomes carry highly diverse protein repertoires associated with vesicle trafficking, immune modulation, cytoskeletal remodeling, metabolism, and signal transduction. Across human, bovine, porcine, camel, and other mammalian milk sources, common exosomal markers such as CD9, CD63, CD81, and TSG101 have been consistently detected, supporting the conserved nature of these vesicles. At the same time, species-specific proteomic signatures suggest biological specialization depending on the origin of the milk. Functional annotation of identified proteins indicates involvement in host defense, epithelial maintenance, extracellular matrix interactions, and cell communication, reinforcing the view that milk exosomes are not passive carriers but biologically active entities. Stability testing represents one of the strongest findings in the reviewed literature. Milk-derived exosomes show remarkable resistance to environmental stress, including heating, pH variation, enzymatic digestion, and prolonged storage under selected conditions. Their resilience in simulated gastric and intestinal fluids suggests that they can survive the harsh gastrointestinal environment, making them especially attractive for oral delivery systems. Several studies reported that vesicle morphology and cargo integrity were retained after exposure to high temperatures and digestive enzymes, although the degree of resistance depended on isolation purity and storage conditions. This stability is a key advantage over many synthetic or cell-derived nanocarriers and supports the feasibility of oral therapeutic formulations.

The functional literature further indicates that milk exosomes possess multiple bioactivities. In cellular and animal models, they have been associated with immunomodulatory effects, anti-inflammatory

responses, oxidative stress reduction, and improved epithelial barrier function. Some studies reported protective effects in intestinal injury and necrotizing enterocolitis models, while others showed attenuation of inflammatory signaling in arthritic or epithelial systems. Milk exosomes have also been explored as drug delivery vehicles for bioactive compounds such as curcumin, paclitaxel, and siRNA, with evidence of improved bioavailability, enhanced cellular uptake, and selective targeting. Their endogenous origin, low toxicity, and natural membrane composition provide advantages over many engineered nanocarriers. Nevertheless, the review also identifies unresolved issues, including heterogeneity in reporting standards, limited dose-response data, insufficient mechanistic clarification of uptake pathways, and a lack of standardized purity benchmarks. These limitations reduce confidence in cross-study comparison and complicate progress toward regulatory acceptance.

Conclusion

Milk-derived exosomes represent a robust and versatile natural nanoplatform with strong potential for diagnostics, oral delivery, immune modulation, and therapeutic cargo transport. The reviewed evidence supports their favorable stability, conserved exosomal markers, functional bioactivity, and practical scalability as a biomaterial source. Among available methods, size-exclusion chromatography and carefully optimized ultracentrifugation workflows appear most suitable when both purity and functionality are required. However, meaningful clinical translation will depend on standardized isolation and characterization protocols, better reporting of purity and yield metrics, and rigorous evaluation of safety, biodistribution, and long-term biological effects. Future studies should prioritize harmonized analytical frameworks and head-to-head methodological comparisons to strengthen reproducibility. Overall, milk-derived exosomes are positioned as a compelling platform for next-generation biomedical applications, provided that the current methodological variability is addressed with greater technical and regulatory rigor.

اگزوزوم‌های مشتق از شیر: رویکردهای بهینه استخراج، مشخصه‌یابی پروتئومیک، پایداری و کاربردهای زیست‌دارویی

امین عباسی^{۱،۲}، هادی قنبری^۲، محمد علی تربتی^۱، پارمیس میرزائی^۳، لیلی عاقبتی ملکی^۴ *

^۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه. اگزوزوم‌ها به‌عنوان وزیکول‌های نانومتری، نقشی محوری در ارتباطات بین‌سلولی ایفا می‌کنند و در این میان، شیر پستانداران به دلیل ایمنی، دسترسی آسان و صرفه اقتصادی، منبعی ایده‌آل برای تولید آن‌ها محسوب می‌شود. با وجود رشد مطالعات در این حوزه، شواهد موجود به‌دلیل ناهمگونی در منابع زیستی، پروتکل‌های جداسازی، معیارهای خلوص و ارزیابی پایداری، پراکنده است. این مقاله مروری ضمن پر کردن این شکاف تحقیقاتی، به مقایسه‌ای انتقادی و نظام‌مند میان منابع مختلف شیر و روش‌های جداسازی (از منظر خلوص، بازده، ظرفیت پروتئومیک، پایداری و کاربردهای ترجمه‌ای) می‌پردازد تا پتانسیل‌های زیست‌پزشکی این نانوزیکول‌ها را تبیین کند.

روش کار. در این مطالعه مرور تحلیلی داده‌های مربوطه با جستجوی کلیدواژه‌های اگزوزوم‌های مشتق از شیر، منابع، رویکرد استخراج، پروتئومیک، پایداری، کاربرد زیست‌دارویی، در پایگاه‌های اطلاعاتی وب آو ساینس، پابمد، مدلاین و اسکاپوس بدون محدودیت زمانی آغازین تا جولای ۲۰۲۶ انجام شده است. تمامی منابع مرتبط با مطالعات تجربی وارد مطالعه شده و منابعی که حاوی متن کامل نبودند از مطالعه خارج شدند.

یافته‌ها. مرور مطالعات نشان داد که اگزوزوم‌های مشتق از شیر توانایی عبور از سد‌های زیستی، ورود به سلول‌ها و انتقال محموله‌های زیستی شامل پروتئین‌ها، mRNA، miRNA و لیپیدها را دارند و می‌توانند عملکرد سلول‌های گیرنده را تعدیل کنند. همچنین، وجود آلاینده‌ها بر خلوص اگزوزوم‌ها اثرگذار بوده و به‌کارگیری روش‌های جداسازی قابل تکرار مانند سانتریفیوژ تفاضلی، اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی، کروماتوگرافی حذف اندازه و رسوب‌دهی ExoQuick برای دستیابی به خلوص بالا ضروری است. مطالعات پروتئومیک مبتنی بر LC-MS/MS امکان شناسایی دقیق ترکیبات اگزوزومی و درک بهتر زیست‌تولید و عملکرد آن‌ها را فراهم کرده‌اند. همچنین، شواهد نشان می‌دهد اگزوزوم‌های شیر در شرایط دمایی و محیط‌های شبیه‌سازی‌شده گوارشی از پایداری مناسبی برخوردارند و از محموله خود محافظت می‌کنند. پژوهش‌های پیش‌بالینی نیز بر نقش زیست‌فعال و ظرفیت دارورسانی این اگزوزوم‌ها در کاربردهای درمانی و همچنین به‌عنوان نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی تشخیص بیماری‌ها تأکید دارند.

نتیجه‌گیری. اگزوزوم‌های مشتق از شیر به‌دلیل پایداری زیستی، ظرفیت انتقال مؤثر محموله‌های مولکولی و زیست‌سازگاری بالا، گزینه‌ای امیدبخش در کاربردهای زیست‌پزشکی و سامانه‌های نوین دارورسانی به‌شمار می‌روند. با این حال، استانداردسازی روش‌های جداسازی و ارزیابی‌های بالینی بیشتر برای بهره‌برداری درمانی آن‌ها ضروری است.

پیامدهای عملی. اگزوزوم‌های مشتق از شیر می‌توانند به‌عنوان نانوحامل‌های طبیعی، ایمن و زیست‌سازگار برای انتقال داروها و مولکول‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرند. پایداری مناسب و توانایی عبور از سد‌های زیستی، این ساختارها را به گزینه‌ای امیدبخش برای توسعه سامانه‌های نوین دارورسانی، غذاهای فراسودمند و نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی در تشخیص بیماری‌ها تبدیل می‌کند.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۵/۳/۲

اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۵/۲۴

پذیرش: ۱۴۰۵/۵/۲۶

انتشار برخط: ۱۴۰۵/۶/۱۴

کلیدواژه‌ها:

- اگزوزوم‌های مشتق از شیر
- منابع
- رویکرد استخراج
- پروتئومیک
- پایداری
- کاربرد زیست‌دارویی

مقدمه

اگزوزوم‌ها و زیکول‌های نانومتری دولایه با منشأ آندوسیتی هستند که توسط انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران به‌طور فعال ترشح می‌شوند و در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک از طریق انتقال محتوای عملکردی فعال و اختصاصی هر سلول از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها و RNAها در ارتباطات بین‌سلولی نقش دارند.^۱ این زیکول‌های غشادار با اندازه‌ای در حدود ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر در تمامی مایعات زیستی از جمله خون، بزاق، ادرار، مایع منی، مایع آمنیوتیک و شیر پستان‌شناسایی شده‌اند. ویژگی‌های ذاتی اگزوزوم‌ها، از جمله نیمه‌عمر طولانی در گردش خون، سازگاری زیستی مناسب، اختصاصیت در هدف‌گیری سلولی (از طریق اتصال لیگاندها)، قابلیت درونی‌سازی توسط سلول‌های دیگر و توانایی حمل و انتقال درشت‌مولکول‌ها سبب شده است که این ساختارها به‌عنوان سامانه‌های انتقال درمانی و همچنین نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی تشخیصی مورد توجه گسترده قرار گیرند.^{۲،۳} در میان تمامی مایعات زیستی، شیر به‌عنوان یک منبع طبیعی بالقوه برای تولید انبوه اگزوزوم‌ها توجه جامعه علمی را به خود جلب کرده است؛ زیرا از نظر دسترسی گسترده هزینه پایین و ایمنی مناسب مزیت‌های قابل توجهی دارد. شیر پستانداران مایعی پیچیده و ناهمگن است که از اجزای زیست‌فعال منحصربه‌فردی تشکیل شده و برای تأمین نیازهای فیزیولوژیک، عصبی و ایمنی نوزادان ضروری است. این مایع حاوی ترکیبی از پروتئین‌ها، پپتیدها، الیگوساکاریدها، اسیدهای چرب چندغیراشباع زنجیره‌بلند (Polyunsaturated fatty acids)، میکروارگانیزم‌های مفید و اجزای مختلف ایمنی (لاکتوفرین، لاکتالبومین و لاکتادرین) است.^۴ نقش این ترکیبات زیست‌فعال در تنظیم سیستم ایمنی و رشد و تکامل بدن به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است.

با وجود رشد چشمگیر مطالعات مرتبط با اگزوزوم‌های مشتق از شیر در سال‌های اخیر، شواهد موجود همچنان از نظر نوع منبع زیستی، روش‌های جداسازی، معیارهای ارزیابی خلوص و بازده، شیوه‌های مشخصه‌یابی مولکولی، و شرایط بررسی پایداری، ناهمگون و پراکنده است. بخش قابل‌توجهی از مطالعات منتشرشده، هر یک تنها بر یک گونه شیری، یک پروتکل جداسازی یا یک کاربرد خاص تمرکز داشته‌اند؛ ازاین‌رو، امکان مقایسه مستقیم و نظام‌مند میان یافته‌ها محدود است. افزون بر این، تفاوت در پیش‌تیمار نمونه‌ها، وجود آلاینده‌هایی نظیر کازئین، پروتئین‌های آب‌پنیر و لیپوپروتئین‌ها و نیز تنوع در روش‌های ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اگزوزوم‌ها، تفسیر نتایج و تعمیم‌پذیری آن‌ها را با چالش مواجه ساخته است. در چنین شرایطی، هنوز اجماع روشنی درخصوص

مناسب‌ترین روش جداسازی برای دستیابی همزمان به خلوص مطلوب، بازده قابل قبول، حفظ یکپارچگی زیستی و قابلیت مقیاس‌پذیری وجود ندارد؛ همچنین، مشخص نیست که کدام منبع شیری در زمینه‌های مختلف پژوهشی، پیش‌بالینی یا صنعتی، مزیت نسبی بیشتری دارد.

بر این اساس، ضرورت انجام یک مرور تحلیلی و انتقادی که بتواند شواهد پراکنده موجود را در چارچوبی مقایسه‌ای تجمیع و تفسیر کند، بیش از پیش آشکار می‌شود. نوآوری این مقاله نه صرفاً در گردآوری مطالعات منتشرشده، بلکه در یکپارچه‌سازی و تحلیل انتقادی ارتباط میان چهار محور کلیدی، شامل منبع شیر، راهبرد جداسازی، مشخصه‌یابی پروتئومیک و پایداری اگزوزوم‌ها و در نهایت پیوند دادن این مؤلفه‌ها با ظرفیت‌های زیست‌پزشکی و دارورسانی آن‌ها است. چنین رویکردی می‌تواند به شناسایی خلأهای دانش موجود، تبیین محدودیت‌های روش‌شناختی مطالعات پیشین و جهت‌دهی دقیق‌تر به پژوهش‌های آینده و توسعه کاربردهای انتقالی این نانوزیکول‌ها کمک کند. بنابراین، هدف این مقاله، ارائه یک مرور تحلیلی و انتقادی از شواهد موجود در زمینه اگزوزوم‌های مشتق از شیر با تأکید بر چهار محور اصلی، شامل منابع زیستی، روش‌های جداسازی، ویژگی‌های پروتئومیک و پایداری است. در این راستا، این مطالعه چند هدف مشخص را دنبال می‌کند: نخست، مقایسه روش‌های متداول جداسازی اگزوزوم‌های شیر از منظر خلوص، بازده، حفظ ویژگی‌های ساختاری و عملکردی، زمان و پیچیدگی فرآیند و قابلیت استفاده در مقیاس‌های پژوهشی و صنعتی؛ دوم، بررسی تطبیقی منابع مختلف شیر، از جمله شیر انسان، گاو، خوک، شتر و باک، از نظر ویژگی‌های مولکولی، ظرفیت زیستی و پتانسیل کاربردی؛ سوم، تحلیل تأثیر منبع زیستی و روش جداسازی بر نتایج حاصل از مطالعات پروتئومیکس و چهارم، ارزیابی شواهد مربوط به پایداری اگزوزوم‌ها در شرایط نگهداری، فرآوری و محیط شبیه‌سازی‌شده گوارشی. افزون بر این، مقاله حاضر درصدد است سطح شواهد موجود درباره کاربردهای زیست‌پزشکی این اگزوزوم‌ها را به‌صورت انتقادی بررسی کند و محدودیت‌های اصلی در مسیر ترجمه یافته‌های آزمایشگاهی به کاربردهای بالینی و صنعتی را مشخص سازد. شایان ذکر است که هدف این مرور، معرفی یک روش جداسازی یا یک منبع شیری به‌عنوان گزینه مطلقاً برتر در تمامی شرایط نیست؛ بلکه تمرکز اصلی در تبیین تناسب هر روش و هر منبع با توجه به هدف پژوهش، الزامات تحلیلی و بستر کاربردی آن می‌باشد. ازاین‌رو، نتیجه‌گیری‌های ارائه‌شده در این مقاله بر پایه ارزیابی تطبیقی شواهد و با در نظر گرفتن ناهمگونی روش‌ها و محدودیت‌های مطالعات موجود صورت گرفته است.

روش کار

مطالعه حاضر به صورت یک مرور ساختاریافته و انتقادی با هدف جمع آوری، تحلیل و ارزیابی کیفیت شواهد تجربی پیرامون اگزوزوم‌های مشتق از شیر انجام شد. جهت تضمین جامعیت و تکرارپذیری فرآیند جستجو، یک غربالگری ساختارمند در پایگاه‌های اطلاعاتی بین‌المللی PubMed/MEDLINE، Scopus و Web of Science تا جولای ۲۰۲۶ انجام گرفت. جستجو بدون محدودیت زمانی آغازین و با استفاده از فرمول ترکیبی زیر (شامل عملگرهای منطقی Boolean و کلیدواژه‌های اختصاصی مربوط به گونه‌های مختلف شیر و روش‌های استخراج) انجام شد:

("milk-derived exosome*" OR "milk exosome*" OR "milk extracellular vesicle*" OR "bovine milk exosome*" OR "human milk exosome*" OR "porcine milk exosome*" OR "camel milk exosome*" OR "yak milk exosome*" OR "colostrum exosome*") AND ("isolation" OR "extraction" OR "purification" OR "characterization" OR "differential centrifugation" OR "density gradient" OR "size-exclusion chromatography" OR "ExoQuick" OR "proteomic*" OR "stability" OR "drug delivery" OR "therapeutic*")

مقالات پژوهشی اصیل وارد فرآیند تحلیل شدند که به طور مشخص به بررسی اگزوزوم‌های استخراج شده از شیر انسان یا گونه‌های دامی (گاو، خوک، شتر و یاک) در دو فاز آغوز (Colostrum) و شیر بالغ (Mature) پرداخته بودند. به منظور ارتقای سطح کیفی این مرور، مقالاتی وارد تحلیل نهایی شدند که پروتکل مشخصی برای تأیید هویت و مشخصه‌یابی فیزیکیوشیمیایی اگزوزوم‌ها بر اساس دستورالعمل‌های بین‌المللی MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles) ارائه کرده بودند. این معیارها شامل گزارش حداقل دو مورد از موارد زیر بود: (۱) بررسی مورفولوژی

جدول ۱. منابع اگزوزوم‌های مشتق از شیر و ویژگی‌های گزارش شده آن‌ها.

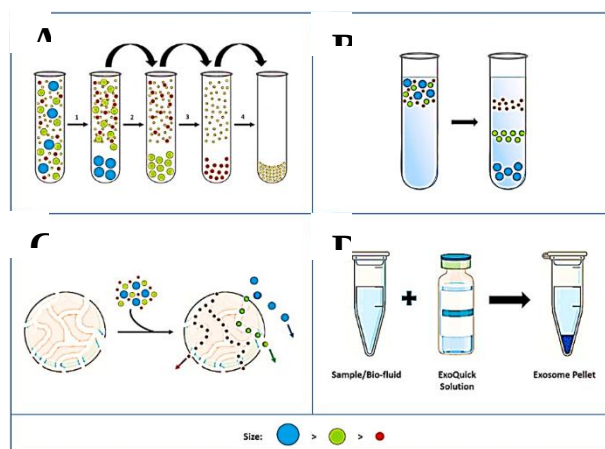
منابع اگزوزوم‌ها	ویژگی‌های گزارش شده	مدل/روش استفاده شده	منبع
شیر انسان	غنی از تعدیل‌کننده‌های ایمنی	بررسی پاسخ سلول‌های T تنظیمی به اگزوزوم‌ها	۶
	دارای فعالیت ضدالتهابی در آسیب ارگانوئیدهای روده‌ای	ایلوئوم انتهایی جدا شده استخراج شده از نوزادان موش‌های C57BL/6	۷
	عامل محافظتی در برابر انتقال عمودی HIV-1	آنالیز عفونت HIV-1 در سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت (MDDCs) و سلول‌های CD4 ⁺ T بر اساس تعیین میزان بیان p24	۸
شیر گاو	کاهش علائم آرتریت	آرتریت القا شده با کلاژن در موش‌های فاقد IL-1Ra	۹
	اثرات سودمند در آنتروکولیت نکروزان (NEC) از طریق افزایش بیان سلول‌های گابلت	رده سلولی کولون انسانی LS174T و موش‌های C57BL/6 مبتلا به آنتروکولیت نکروزان القا شده.	۱۰
شیر خوک	غنی شده با پروتئین‌های دخیل در پاسخ ایمنی و رشد	مشخصه‌یابی بیوفیزیکی اگزوزوم‌های جدا شده	۱۱
	تحریک تکثیر سلول‌های روده و بهبود عملکرد دستگاه گوارش	رده سلولی IPEC-J2 (انتروسیت‌های روده‌ای خوک)	۱۲
شیر شتر	فعالیت ضدسرطانی از طریق القای آپوپتوز و مهار استرس اکسیداتیو	سلول‌های سرطان پستان MCF7	۱۳
	ویژگی‌های تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی	سمیت ایمنی و استرس اکسیداتیو القا شده توسط سیکلوفسفامید در موش‌های صحرایی آلبینو	۱۴
شیر یاک	القای تحمل هیپوکسی	رده سلولی اپی‌تلیال روده (IEC-6)	۱۵

زمان‌های افزایشی است. در مراحل اولیه، ذرات بزرگ‌تر رسوب می‌کنند و اغلب ذرات کوچک‌تر در سوپرناتانت باقی می‌مانند و در مراحل بعدی سانتریفیوژ می‌شوند. ساموئل و همکاران از سانتریفیوژ تفاضلی برای جداسازی اگزوزوم‌ها از آغوز و شیرگاو استفاده کردند. در روش آن‌ها ابتدا نمونه شیر با نیروی g ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا چربی‌های شناور شیر حذف شوند. سپس سه مرحله سانتریفیوژ متوالی با نیروهای g ۱۲,۰۰۰، g ۳۵,۰۰۰ و g ۷۰,۰۰۰ (هر بار به مدت یک ساعت در چهار درجه سانتی‌گراد) برای حذف کازئین و سایر بقایای سلولی انجام شد. در ادامه، اولتراسانتریفیوژ با نیروی g ۱۰۰,۰۰۰ برای افزایش خلوص اعمال شد و رسوب حاصل در 0.5 میلی‌لیتر PBS معلق‌سازی شد و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اندازه وزیکول‌های حاوی اگزوزوم‌ها ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر گزارش شد که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری تعیین شد.^{۱۱} از نظر مفهومی، این روش به‌سادگی قابل اجرا است؛ با این حال با محدودیت‌هایی از جمله نیاز به حجم بالای نمونه و همچنین خطر تخریب وزیکول‌ها و آلودگی آن‌ها با ذرات غیر وزیکولی نیز همراه است.

اولتراسانتریفیوژ با گرادین چگالی (Density gradient ultracentrifugation): در این روش از تفاوت اندازه و چگالی اگزوزوم‌ها برای جداسازی آن‌ها استفاده می‌شود و اولتراسانتریفیوژ با یک گرادین چگالی ترکیب می‌گردد. در این فرآیند، نمونه حاوی درشت‌مولکول‌هایی با اندازه‌های مختلف بر روی سطح گرادینی قرار می‌گیرد که چگالی آن از بالا به پایین به‌صورت خطی افزایش می‌یابد.^{۱۹} گرادین چگالی ساکارز، استاندارد طلایی و پرکاربردترین روش برای جداسازی مولکول‌های زیستی است. برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر، پروتکل مورد استفاده بسیار مشابه سانتریفیوژ تفاضلی متداول است، با این تفاوت که در مرحله نهایی اولتراسانتریفیوژ، یک گرادین چگالی خطی ساکارز (۱۰ تا ۴۰ درصد وزنی/حجمی) به‌عنوان یک لایه تصفیه‌کننده برای افزایش خلوص اگزوزوم‌ها به‌کار گرفته می‌شود.^{۲۰} اگرچه این روش نسبت به سانتریفیوژ تفاضلی معمولی پیچیده‌تر و زمان‌برتر است، اما امکان دستیابی به اگزوزوم‌های بسیار خالص، این موارد را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد.

کروماتوگرافی مایع حذف /اندازه (Size-exclusion chromatography): این تکنیک شامل جداسازی کروماتوگرافی اگزوزوم‌ها بر اساس اندازه آن‌ها در یک محلول حاوی مخلوطی از زیست‌مولکول‌ها است. رویکرد متداول در این روش شامل اولتراسانتریفیوژ نمونه و متعاقباً به‌کارگیری کروماتوگرافی مایع حذف اندازه برای تفکیک دقیق‌تر اگزوزوم‌ها بر مبنای اندازه است. بلاس و همکاران روشی را برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر انسان و گاو بر

در این بخش، این پرسش کلیدی بررسی می‌شود که کدام یک از روش‌های رایج جداسازی (نظیر سانتریفیوژ افتراقی، ترسیب پلیمری، کروماتوگرافی طرد اندازه و اولترافیلتراسیون) می‌توانند توازن بهینه‌ای میان میزان خلوص، بازده نهایی و حفظ یکپارچگی زیستی اگزوزوم‌ها برقرار کنند و محوریت عمده آن شناسایی محدودیت‌های هر روش در حذف آلاینده‌های پروتئینی شیر و تبیین تناسب هر پروتکل با مقیاس‌های مختلف پژوهشی و صنعتی است. وجود ذرات آلاینده خارجی، درشت‌مولکول‌های اختصاصی سلولی (پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک) و سایر اجزای سلولی می‌تواند به‌شدت بر خلوص اگزوزوم‌های استخراج‌شده تأثیر بگذارد. از این‌رو، استفاده از روش‌های جداسازی قوی و قابل تکرار برای دستیابی به اگزوزوم‌هایی با خلوص بالا ضروری است. اگرچه روش‌های متعددی در این زمینه گزارش شده‌اند،^{۱۶} با این حال برای افزایش کارایی، سرعت جداسازی و مقرون‌به‌صرفه بودن روش‌های موجود برای استخراج اگزوزوم‌های مشتق از شیر، همچنان به بهینه‌سازی روش‌شناسی نیاز است. برخی از روش‌های متداول و به‌خوبی بررسی‌شده برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر در شکل ۱ نشان داده شده‌اند و در ادامه توضیح داده می‌شوند.



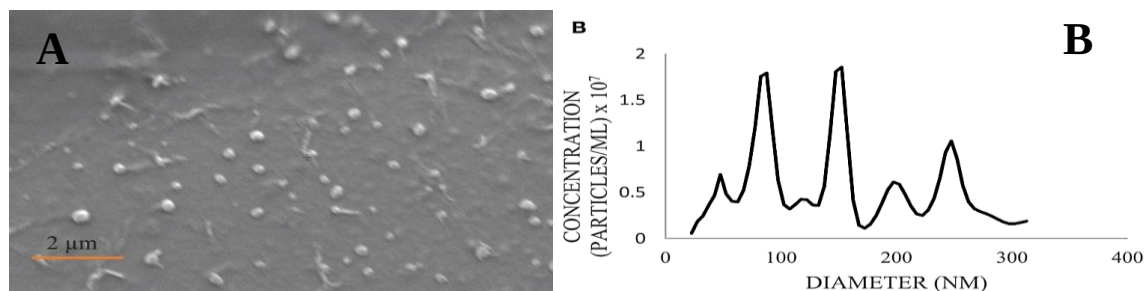
شکل ۱. رویکردهای جداسازی اگزوزوم‌ها شامل سانتریفیوژ تفاضلی (A)، اولتراسانتریفیوژ با گرادین چگالی (B)، کروماتوگرافی مایع بر پایه جداسازی بر اساس اندازه (C) و رسوب‌دهی به روش ExoQuick (D) می‌باشد. این شکل با کسب اجازه از منبع^{۱۷} اقتباس شده است.

سانتریفیوژ تفاضلی (Differential centrifugation): این روش یکی از پرکاربردترین تکنیک‌ها برای جداسازی و خالص‌سازی وزیکول‌های خارج‌سلولی بر پایه سرعت رسوب‌گذاری ذرات است.^{۱۸} برای جداسازی اگزوزوم‌ها، نمونه‌های شیر تحت سانتریفیوژ تفاضلی قرار می‌گیرند که شامل مجموعه‌ای از مراحل سانتریفیوژ با نیرو و

(Nanoparticle tracking analysis) که بازدهی $10^9 \times 1/9$ ذره در هر میلی‌لیتر را نشان داد، مشخصه‌یابی کردند (شکل ۲ A, B). این روش امکان جداسازی سریع، مقیاس‌پذیر و کمی آگروزوم‌ها را از حجم‌های بسیار کم نمونه (حتی ۱ میلی‌لیتر) فراهم می‌کند، بدون آن‌که نیاز به استفاده از اولتراسانتریفیوژ باشد؛ عاملی که احتمالاً دلیل کاربرد گسترده و گزارش‌شده آن در بسیاری از مطالعات علمی است.^{۳۳} همان‌گونه که در بخش‌های پیشین اشاره شد، روش‌های مختلفی برای جداسازی آگروزوم‌ها از جمله سانتریفیوژ تفاضلی، اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی، کروماتوگرافی مایع حذف اندازه و رسوب‌گذاری ExoQuick مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این راستا، توجه به مطالعات پروتئومیکس یعنی شناسایی و تحلیل تمامی پروتئین‌های موجود در یک سیستم زیستی شامل توزیع مکانی پروتئین‌ها، پویایی زمانی آن‌ها، پاسخ به محرک‌های محیطی و تفاوت میان وضعیت‌های سالم و بیمار و همچنین بررسی تغییرات پایداری آگروزوم‌ها ضروری است. از این‌رو، در بخش بعدی به بررسی پروتئومیکس و پویایی پایداری آگروزوم‌های مشتق از شیر می‌پردازیم (جدول ۲).

پایه کروماتوگرافی حذف اندازه توسعه دادند. این تکنیک منجر به جداسازی مؤثر و تکرارپذیر آگروزوم‌ها از شیر خام شد و جداسازی کارآمد آگروزوم‌ها از اجزای اصلی پروتئینی یعنی کازئین و پروتئین‌های آب پنیر را میسر ساخت. نمونه‌های آگروزومی استخراج‌شده از شیر، در شاخص‌های لاکتادرین، CD9، CD63 و CD81 غنی بوده و فاقد پروتئین‌های نشانگر خارج‌عروقی بودند.^{۳۱} یکی از مزایای ویژه این روش، قابلیت استفاده از بافرهایی با اسمولاریته و ویسکوزیته فیزیولوژیک است که مانع از دست رفتن عملکرد زیستی آگروزوم‌های جدا شده می‌گردد.

رسوب‌گذاری ExoQuick (ExoQuick precipitation): محصول ExoQuick™ یک پلیمر اختصاصی است که توسط شرکت System Biosciences (کالیفرنیا، آمریکا) توسعه یافته و به صورت تجاری برای جداسازی آگروزوم‌ها از مایعات زیستی انسانی و محیط‌های کشت سلولی عرضه می‌شود.^{۳۲} دیانا و همکاران جداسازی آگروزوم‌ها را با روش رسوب‌گذاری گزارش کردند. آن‌ها آگروزوم‌های به‌دست‌آمده را با میکروسکوپ الکترونی روبشی با اندازه تقریبی ۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر و همچنین با فناوری ردیابی نانوذرات



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (A) و آنالیز ردیابی نانوذرات (B) از آگروزوم‌های جدا شده به روش رسوب‌دهی. این تصویر از منبع^{۳۳} اقتباس شده و تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY) بازنشر شده است.

جدول ۲. مقایسه روش‌های اصلی جداسازی آگروزوم‌های شیر از نظر خلوص، بازده، هزینه، زمان، کاربرد و محدودیت‌ها.

روش جداسازی	خلوص	بازده/بازیابی	هزینه	زمان	کاربرد/مزیت گزارش شده	محدودیت‌های گزارش شده
سانتریفیوژ تفاضلی	پایین تا متوسط	متوسط	پایین	متوسط	جداسازی اولیه، نمونه‌های حجیم، آزمایشگاه‌های با تجهیزات معمول	نیاز به حجم بالای نمونه؛ خطر تخریب و زیکول‌ها؛ احتمال آلودگی با ذرات غیروزیکولی
اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی ساکارز	بسیار بالا	متوسط تا پایین	بالا	نسبت به سانتریفیوژ تفاضلی زمان برتر است	به عنوان «Standard gold» و روش پرکاربرد برای جداسازی مولکول‌های زیستی توصیف شده است	پیچیده، زمان‌بر، نیازمند تجهیزات پیشرفته و نیروی ماهر
کروماتوگرافی حذف اندازه	بالا	متوسط	متوسط	پایین تا متوسط	جداسازی کارآمد و زیکول‌های آگروزومی از کازئین و پروتئین‌های آب‌پنیر؛ استفاده از بافر با اسمولاریته/ویسکوزیته فیزیولوژیک و حفظ عملکرد زیستی	ظرفیت محدود نمونه، رقیق شدن نمونه، گاهی نیاز به مرحله تغلیظ بعدی
ترسیب ExoQuick	متوسط تا پایین	بالا	متوسط تا بالا	پایین	غریبالگری سریع، حجم نمونه کم، کاربردهای معمول و تعداد نمونه بالا	هم‌رسوبی آلاینده‌ها، کاهش خلوص، احتمال تداخل پلیمر با برخی آزمون‌های پایین‌دستی، نیاز به اعتبارسنجی

پروتئومیکس و پویایی پایداری

پروتئومیکس/اگزوزوم‌های مشتق از شیر

در این بخش، این سؤال مطرح می‌شود که راهبردهای مختلف جداسازی و تفاوت در گونه‌های شیری چگونه پروفایل پروتئینی و پیام‌های مولکولی اگزوزوم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. محوریت این بحث بر شناسایی مارکرهای اختصاصی اگزوزومی و تحلیل تأثیر روش‌های تحلیلی (مانند MS/MS) بر دقت شناسایی محتوای پروتئومیک استوار است. درک فرآیند زیست‌زایی و اثرات سلولی اگزوزوم‌ها از طریق فهرست‌بندی پروتئومیک اگزوزوم‌ها و محتوای آن‌ها امکان‌پذیر است. پروتئین‌ها، mRNA، miRNA و لیپیدها از اجزای رایج موجود در اگزوزوم‌ها هستند. اندازه‌گیری مستقیم پپتیدها و پروتئین‌ها بر اساس توان تفکیک بالای روش LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) به‌طور گسترده به‌عنوان رویکردی برای مطالعه پروتئومیکس اگزوزوم‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.^{۲۴} روش LC-MS/MS که یک تکنیک کمی و بدون نیاز به برچسب‌گذاری است، برای ارزیابی مایعات زیستی بسیار مناسب محسوب می‌شود. این روش با کاهش میزان دستکاری نمونه، از ایجاد تغییرات ناخواسته در پروتئین‌ها و پپتیدها جلوگیری کرده و همچنین اتلاف نمونه در طی مراحل پردازش را به حداقل می‌رساند.^{۲۵}

دانش جامع درباره پروتئوم اگزوزوم‌های مشتق از شیر هنوز در مراحل اولیه توسعه قرار دارد. در ادامه، برخی از مطالعات شاخص که بینش‌هایی درباره پروتئومیکس اگزوزوم‌های مشتق از شیر انسان، گاو و خوک ارائه داده‌اند، مورد بررسی قرار می‌گیرند. راین‌هارت و همکاران اگزوزوم‌ها را از شیر گاوهای نژاد هولشتاین در مرحله میانی شیردهی با استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ همراه با گرادیان چگالی ساکارز جداسازی کردند. اگزوزوم‌های هضم‌شده با تریپسین تحت کروماتوگرافی فاز معکوس در pH بالا قرار گرفتند و سپس برای انجام تحلیل پروتئومیک در یک سیستم نانو-کروماتوگرافی مایع متصل به طیف‌سنج جرمی دومرحله‌ای تفکیک شدند. در این مطالعه در مجموع ۲۱۰۷ پروتئین شناسایی شد که در جدول ۳ فهرست شده‌اند و شامل نشانگرهای مهم پروتئینی اگزوزومی نیز می‌باشند. نتایج نشان داد که پروتئین‌های غشاء گلبول چربی شیر، از جمله بوتیروفیلین، زانتین اکسیداز، آدیپوفیلین و لاکتادرین، به‌طور فراوان در اگزوزوم‌های شیر حضور دارند. این مطالعه همچنین توضیح داد که پروتئوم اگزوزوم‌ها می‌تواند بسته به مرحله شیردهی و یا تعداد سلول‌های سوماتیک موجود در نمونه شیر متفاوت باشد. با استفاده از پایگاه داده Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)، پژوهشگران پروتئین‌هایی را شناسایی کردند که در تشکیل، ساختار و

انتقال وزیکول‌ها نقش دارند و این پروتئین‌ها در تعداد بسیار بالایی در نمونه‌ها مشاهده شدند.^{۲۶}

یانگ و همکاران از یک روش پیشرفته پروتئومیک (Isobaric tags) LC-MS/MS همراه با iTRAQ (for relative and absolute quantitation) برای بررسی اگزوزوم‌های شیر با بیان تفاضلی استفاده کردند. آن‌ها بیش از ۹۰۰ پروتئین اگزوزومی شیر را در نمونه‌های آغوز و شیر انسان و گاو شناسایی و کمی‌سازی کردند که از میان آن‌ها، ۵۷۵ پروتئین بین گونه‌ها بیان تفاضلی نشان دادند. تحلیل عملکردی نشان داد که پروتئین‌های اگزوزومی عمدتاً در فرآیند اتصال نقش دارند در حالی که سایر کارکردها شامل پاسخ به محرک‌ها، مکان‌یابی (Localization) و سازمان‌دهی اجزای سلولی است.^{۲۴} نتایج این تحلیل همچنین نشان داد که پروتئین‌های اگزوزومی شیر در چندین مسیر زیستی KEGG؛ از جمله تنظیم اسکلت سلولی اکتین، گلیکولیز/گلوکونئوز، مهاجرت ترانس‌اندوتلیالی لکوسیت‌ها، بیوسنتز آمینواسیدها، tRNA، مسیر پنتوز فسفات، متابولیسم گالاکتوز و بیوسنتز اسیدهای چرب مشارکت دارند.^{۲۴} چن و همکاران تحلیل ترنسکریپتومیک و پروتئومیک mRNAها و پروتئین‌های موجود در اگزوزوم‌های شیر خوک را انجام دادند. نمونه‌های شیر از ۱۰ خوک ماده سالم از نژاد لندریس جمع‌آوری و اگزوزوم‌ها با استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ جداسازی شدند. اگزوزوم‌های هضم‌شده با تریپسین برای تحلیل پروتئومیک تحت روش (Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry) LC-ESI-MS/MS قرار گرفتند. نتایج این مطالعه با استفاده از توالی‌یابی RNA و تحلیل‌های پروتئومیک، شناسایی ۱۶/۳۰۴ مولکول mRNA و ۶۳۹ پروتئین را در اگزوزوم‌های شیر خوک نشان داد که بسیاری از آن‌ها پیش‌بینی می‌شود در ایمنی، تکثیر سلولی و پیام‌رسانی سلولی نقش داشته باشند. تحلیل KEGG نشان داد که بیشتر این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم قرار دارند و عمدتاً در مسیرهای متابولیسم نشاسته و ساکارز، تخریب سایر گلیکان‌ها، متابولیسم گالاکتوز در N-گلیکان‌ها و بیوسنتز گلیکواسفینگولیپیدها مشارکت دارند. جدول ۴ جزئیات اجزای مختلف شناسایی‌شده در نمونه‌های گوناگون شیر را همراه با عملکردهای آن‌ها و روش‌های مورد استفاده در تحلیل پروتئومیکس ارائه می‌دهد.^{۲۷} همان‌طور که در بخش‌های پیشین مطرح شد، مطالعه پروتئومیکس اگزوزوم‌های مشتق از شیر یکی از جنبه‌های مهم برای درک فرآیند زیست‌زایی و اثرات سلولی اگزوزوم‌ها محسوب می‌شود و روش LC-MS/MS یکی از رویکردهای پرکاربرد در این زمینه است. علاوه بر پروتئومیکس، بررسی پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر نیز اهمیت زیادی دارد. از این‌رو، در بخش بعدی پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر مورد بحث قرار می‌گیرد.

جدول ۳. مسیرهای KEGG که در پروتئوم اگزوزوم‌های شیر بر اساس تعداد پروتئین‌های شناسایی‌شده در هر مسیر نمایان شده‌اند. این جدول با کسب اجازه از مرجع^{۲۶} اقتباس شده است.

تعداد پروتئین‌های شناسایی‌شده	مسیرهای KEGG
۴۲	آندوسیتوز
۳۳	تنظیم اسکلت سلولی اکتین
۲۶	اتصال محکم (Tight junction)
۲۴	چسبندگی کانونی (Focal adhesion)
۲۳	مسیر پیام‌رسانی کموکاین
۲۳	مسیرهای مرتبط با سرطان
۲۱	مهاجرت ترانس‌اندوتلیالی لکوسیت‌ها
۲۱	مسیر پیام‌رسانی نوروتروفین
۱۹	مسیر پیام‌رسانی انسولین
۱۹	مسیر پیام‌رسانی MAPK
۱۸	فاگوسیتوز وابسته به گیرنده Fc گاما
۱۸	متابولیسم پورین
۱۶	مولکول‌های چسبندگی سلولی
۱۵	گلیکولیز/گلوکونئوزنز
۱۴	برهم‌کنش گیرنده-ماتریکس خارج‌سلولی
۱۴	چرخه سلولی
۱۳	هدایت آکسونی
۱۲	پردازش و ارائه آنتی‌ژن
۱۲	اتصال چسبیده (Adherens junction)
۱۲	مسیر پیام‌رسانی گیرنده شبه‌تول (Toll-like receptor)

جدول ۴. اجزای مختلف شناسایی‌شده در نمونه‌های شیر و کارکردهای آن‌ها.

روش‌های به‌کاررفته برای تحلیل پروتئومیکس	منابع اگزوزوم‌ها	ترکیبات شناسایی شده	کارکردهای اجزای شناسایی‌شده	منابع
LC-ESI-MS/MS	نمونه‌های شیر خوک	۱۶,۳۰۴ مولکول mRNA و ۶۳۹ پروتئین	به‌طور عمده در فرآیندهای زیستی از جمله تعدیل سیستم ایمنی، تکثیر و پیام‌رسانی سلولی	۲۷
روش پروتئومیکس iTRAQ همراه با LC-MS/MS	نمونه شیر آغوز انسانی و گاوی	بیش از ۹۰۰ پروتئین (۵۷۵ پروتئین بین دو گونه دارای بیان متفاوت بودند)	به‌طور عمده در فرآیندهای زیستی از جمله اتصال، پاسخ به محرک‌ها، مکان‌یابی و سازمان‌دهی اجزای سلولی	۲۴
کروماتوگرافی فاز معکوس با pH بالا و نانولیکوئید کروماتوگرافی متصل به MS/MS	نمونه شیر گاو نژاد هلشتاین	۲۱۰۷ پروتئین (بیشتر آن‌ها نشانگرهای پروتئینی اگزوزومی بودند؛ از جمله پروتئین‌های غشای گلیول چربی شیر مانند بوتیروفیلین، زانتین اکسیداز، آدیپوفیلین و لاکتادرین)	به‌طور عمده در فرآیندهای زیستی از جمله تشکیل وزیکول، ساختار، انتقال داخل سلولی	۲۶

پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر

مایعات زیستی مختلف را دارا هستند. استیکوئیتزا و همکاران زیرجمعیت‌های مختلف اگزوزوم‌ها را در معرض غلظت‌های متفاوتی از مواد شوینده قرار دادند تا حساسیت زیرجمعیت‌های مبتنی بر اندازه را بررسی کنند. آن‌ها از سورفکتانت‌هایی مانند Tween 20، سدیم دودسیل سولفات، داکسی‌کولات و Triton X-100 استفاده کردند. این گروه پژوهشی غلظت بهینه مواد شوینده لازم برای تجزیه هر یک از انواع اگزوزوم‌ها توسط رده‌های سلولی انسانی THP-1، Jurkat، MiaPaCa و U937 را تعیین کردند. برای

در این بخش به بررسی میزان پایداری ساختاری و عملکردی اگزوزوم‌های مشتق از شیر در مواجهه با شرایط محیطی مختلف (دما، زمان نگهداری و چرخه‌های انجماد) و شرایط فیزیولوژیک (محیط اسیدی دستگاه گوارش) می‌پردازیم. همچنین، میزان اثربخشی این نانوزیکول‌ها در دارورسانی و پتانسیل آن‌ها برای اصلاح سطحی بر اساس شواهد موجود ارزیابی می‌شود. به‌طور کلی، اگزوزوم‌ها توانایی محافظت از محتوای خود در برابر تخریب توسط

درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز و قرار گرفتن در چرخه‌های انجماد-ذوب منجر به کاهش قابل‌توجه، اما نه کامل، RNA اگزوزومی شد. در تمامی موارد، اگزوزوم‌های شیر در مقایسه با اگزوزوم‌های مشتق از سرم و ادرار، پروفایل پایداری بهتری نشان دادند.^{۳۱} پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر، همان‌گونه که در بخش پیشین ارایه شد، به‌طور گسترده گزارش شده است. از این رو، بهره‌گیری از اگزوزوم‌های پایدار مشتق از شیر در حوزه‌هایی همچون دارورسانی، بهبود زیست‌فراهمی یا به‌عنوان یک جزء فعال زیستی ذاتی، رویکردی منطقی محسوب می‌شود. همانند هر نانوفرمولاسیون دیگری، محدوده دوز بالینی برای اگزوزوم‌های مشتق از شیر که با هدف تحویل عوامل درمانی به‌کار می‌روند، تحت تأثیر نوع و ماهیت عوامل درمانی بارگذاری شده و کارایی بارگذاری در فرآیند مورد استفاده قرار خواهد داشت. کارایی بالاتر در بارگذاری منجر به کاهش میزان دوز مصرفی می‌گردد. چنین فرض می‌شود که ماهیت پروتئینی و لیپیدی سطح اگزوزوم‌های مشتق از شیر، از طریق تسهیل برهم‌کنش با دارو، به فرآیند بارگذاری کمک می‌کند.^{۳۲} روش‌های متعددی از جمله انکوباسیون، اختلاط مستقیم، الکتروپوراسیون، اکستروژن، سونیکاسیون، ترانسفکشن مرتبط با کلسیم کلراید، چرخه‌های انجماد-ذوب، دیالیز هیپوتونیک و معرف‌های ترانسفکشن (لیپوفکتامین) برای بارگذاری محموله‌های درمانی در اگزوزوم‌ها به‌کار گرفته شده‌اند.^{۳۳} همچنین، اصلاح اگزوزوم‌های مشتق از شیر جهت تقویت هدف‌گیری اختصاصی بافت یا اندام می‌تواند منجر به کاهش بیشتر دوز شود. علی‌رغم زیست‌سازگاری عالی این اگزوزوم‌ها، انجام مطالعات پیش‌بالینی درون‌تنی پیش از کاربردهای بالینی به‌منظور ارزیابی پروفایل سمیت اگزوزوم‌های مشتق از شیر به‌عنوان نانوحامل‌هایی برای عوامل درمانی نوین، ضروری است. در همین راستا، بخش آتی به بررسی کاربرد اگزوزوم‌های مشتق از شیر در حوزه‌های مختلف پزشکی می‌پردازد.

کاربردهای اگزوزوم‌های مشتق از شیر

اگزوزوم‌ها را می‌توان از سلول‌ها و مایعات زیستی مختلف جداسازی کرد، اما تمامی انواع اگزوزوم‌ها برای کاربردهای درمانی و دارورسانی مناسب نیستند. مزایای درون‌زاد هر نوع اگزوزوم مشتق از سلول به‌واسطه کاستی‌های بنیادی آن محدود می‌شود؛ از جمله آن‌ها می‌توان به اختصاصی‌نبودن هدف‌گیری (جذب غیرتخصصی)، یویایی ضعیف در گردش خون (پاک‌سازی سریع و کاهش زیست‌فراهمی) و غلظت یا کارایی ناکافی اجزای درمانی ذاتی اشاره نمود.^{۳۴} در حالی که منابع گوناگونی برای شناسایی منشأهای بالینی

ویژگی‌سنجی این وزیکول‌ها از میکروسکوپ الکترونی عبوری، فناوری Tunable Resistive Pulse Sensing و فلوسایتومتری بهره گرفته شد. نتایج نشان داد اگزوزوم‌ها دارای غشایی با فاز منظم بوده و در مقایسه با سایر وزیکول‌های خارج‌سلولی مانند اکتوزوم‌ها و اجسام آپوپتوتیک، حساسیت بسیار ناچیزی به لیز ناشی از مواد شوینده نشان می‌دهند. افزون بر این، غلظت موردنیاز Triton X-100 و سدیم دودسیل‌سولفات برای لیز اگزوزوم‌ها بیشتر از غلظت لازم برای داکسی‌کولات یا Tween 20 گزارش شد.^{۳۵} مطالعات متعددی درباره پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر انجام شده است. لیائو و همکاران، هضم برون‌زی اگزوزوم‌های مشتق از شیر را با استفاده از پروتکل شبیه‌سازی شده هضم معده‌ای/پانکراسی بررسی کرده و همچنین میزان برداشت آن‌ها توسط سلول‌های اپیتلیال روده را ارزیابی کردند. افزون بر این، آن‌ها پاسخ‌های میکرو RNA را در مراحل ابتدایی، میانی و پایانی شیردهی با استفاده از توالی‌یابی موازی عظیم (Massively parallel sequencing) تحلیل نمودند. نکته قابل‌توجه در این مطالعه، مشاهده ورود اگزوزوم‌های هضم‌شده و هضم‌نشده به هسته سلول‌های شبه‌کریپت روده انسان (Human Intestinal Epithelial Crypt-like cells) بود؛ پدیده‌ای که به‌عنوان نشانه‌ای از تکمیل فرایند هضم در نظر گرفته شد. در مجموع، حدود ۲۸۸ میکرو RNA بالغ از ۲۴ نمونه اگزوزوم شناسایی شد و افزون بر آن، ۶۱۰ میکرو RNA با فراوانی کم نیز گزارش شد. لیائو و همکاران تعداد بیشتری از میکرو RNAهای مرتبط با فرآیندهای رشد سینه‌پس و ایمنی را مشاهده کردند. در میان این میکرو RNAها، فراوان‌ترین مولکول hsa-miR-22-3p بود و ۱۵ میکرو RNA شاخص در مجموع حدود ۱۱ درصد از کل خوانش‌های توالی‌یابی را تشکیل دادند. در نهایت، آن‌ها پس از انجام تمام مراحل هضم، فراوانی پایدار و قابل‌توجهی از اگزوزوم‌های شیر انسان را مشاهده کردند.^{۳۶}

در یک مطالعه مستقل دیگر، رانی و همکاران نشان دادند که اگزوزوم‌های مشتق از شیر قادرند پس از قرار گرفتن در محیط شبیه‌سازی شده هضم معده‌ای و پانکراسی، در مدل آزمایشگاهی همچنان سالم و پایدار باقی بمانند.^{۳۷} برای درک پایداری اگزوزوم‌های شیر، بادلا و همکاران شیر را در معرض شرایط مختلف نگهداری و استفاده (جوشاندن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز و قرار دادن در چرخه‌های انجماد-ذوب) قرار دادند. پس از اعمال هر یک از این شرایط، تحلیل Real-Time برای دو miRNA اگزوزومی انجام شد و RNA اگزوزومی شیر تازه به‌عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که اگزوزوم‌های شیر در طول فرآیند جوشاندن از پایداری بالایی برخوردار هستند. در مقابل، نگهداری در دمای چهار

تکثیر سلولی، گریز از آپوپتوز، القای آنژیوژنز، بازبرنامه‌ریزی متابولیک و غیره و همین امر تردیدهایی درباره استفاده از آن‌ها ایجاد کرده و نیازمند بررسی محتاطانه است.^{۴۰}

برخلاف اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی، اگزوزوم‌های مشتق از شیر از زیست‌سازگاری بسیار مطلوبی برخوردارند، زیرا ترکیب شیمیایی آن‌ها که شباهت زیادی به غشاهای سلولی دارد، ویژگی‌های حساسیت‌زایی پایین و غیرسیتوتوکسیک را برایشان به همراه می‌آورد.^{۴۱} مولکول‌های فعال زیستی (اعم از هیدروفوب و هیدروفیل) که از طریق اگزوزوم‌های شیر منتقل می‌شوند، پایداری استثنایی در دستگاه گوارش نشان می‌دهند و این امر آن‌ها را به گزینه‌هایی مناسب برای توسعه سامانه‌های دارورسانی خوراکی بدل می‌سازد.^{۴۲} علاوه بر این، عاملیت بخشی سطحی اگزوزوم‌های شیر با استفاده از لیگاندهای هدف‌گیرنده می‌تواند اثربخشی درمانی آن‌ها را افزایش داده و سمیت را کاهش دهد.^{۴۳} مطالعات متعدد با استفاده از اگزوزوم‌های شیر برچسب‌گذاری شده با DiR نشان داده‌اند که اگزوزوم‌های مشتق از شیر نیمه‌عمر گردش طولانی‌تری در بدن دارند.^{۴۴} با این حال، برجسته‌ترین مزیت اگزوزوم‌های مشتق از شیر پتانسیل بالای آن‌ها برای مقیاس‌پذیری تجاری است؛ زیرا برخلاف اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ماده اولیه مورد نیاز برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر به راحتی در مقادیر صنعتی قابل تهیه است. زیست‌سازگاری، پایداری و قابلیت مقیاس‌پذیری اگزوزوم‌های مشتق از شیر، آن‌ها را به گزینه‌هایی بسیار مناسب برای کاربردهای بالینی تبدیل کرده است. بخش پیش‌رو به گردآوری و بررسی ادبیات موجود در زمینه کاربردهای دارویی اگزوزوم‌های مشتق از شیر می‌پردازد.

اجزاء ذاتی زیست فعال

تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی در نوزادان

نقش شیر انسان در فراهم‌سازی ایمنی غیرفعال برای نوزادان و همچنین در کمک به رشد و بلوغ دستگاه ایمنی نوزاد به خوبی بررسی شده است. در میان اجزای متعدد مرتبط با ایمنی که در آغوز و شیر بالغ انسان وجود دارند (ایمونوگلوبولین‌ها، سیتوکاین‌ها، الیگوساکاریدها و نوکلئوتیدها)، نقش بالقوه اگزوزوم‌های شیر به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی ایمنی توجه زیادی را به خود جلب کرده است.^{۴۵} کوزاکا و همکاران بیان بالایی miRNAهای ایمنی مرتبط مشتق از اگزوزوم‌های شیر انسان را طی شش ماه نخست شیردهی شناسایی کردند. مطابق با یافته‌های آن‌ها، miR-181a و miR-17 که در تمایز سلول‌های B نقشی پیچیده دارند، با بیان بالا مشاهده شدند (شکل ۳).^{۴۶} نتایج آن‌ها برخی از یافته‌های مطالعات

قابل اعتماد و کارآمد اگزوزوم‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells)، اگزوزوم‌های سلول‌های توموری و اگزوزوم‌های مشتق از شیر به طور گسترده مطالعه و گزارش شده‌اند.

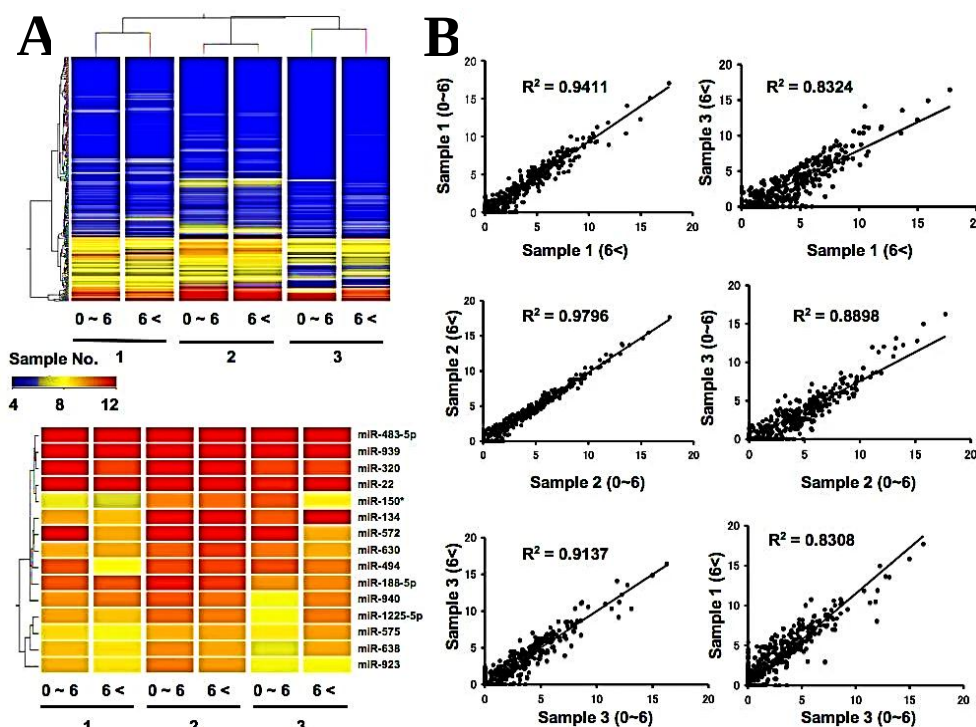
سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی با ظاهری شبیه فیبروبلاست هستند که می‌توان آن‌ها را از بافت‌های بالغ متعددی از جمله بافت چربی، پریوست، کبد، ریه، طحال، بافت همبند عضلانی، مایع آمنیوتیک، جفت، خون بند ناف، پالپ دندان و بافت‌های جنینی سقط‌شده جداسازی کرد.^{۴۷} گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش مهمی در بخش عمده‌ای از عملکردهایی که توسط این بافت‌های بالغ انجام می‌شود، ایفا می‌کنند.^{۴۸} همانند شیر، فرآیند جداسازی و خالص‌سازی این اگزوزوم‌ها را می‌توان با هزینه نسبتاً پایین انجام داد؛ با این حال، برای تولید در مقیاس بزرگ ناگزیر باید به کشت آزمایشگاهی این سلول‌ها تکیه کرد. از آنجا که ظرفیت تکثیر برون‌تنی این رده سلولی محدود است، هزینه‌های تجمعی مربوط به تهیه یک رده سلولی جدید و اعتبارسنجی آن از نظر اقتصادی پدیدار خواهد بود.^{۴۹} پژوهش‌های گسترده در حوزه سرطان منجر به شناسایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی به عنوان میانجی‌های بین سلولی موضعی و سیستمیک انتقال اطلاعات انکوژنیک از طریق انتقال افقی mRNAها، miRNAها و پروتئین‌ها در طی تومورزایی شده است.^{۳۸} سلول‌های سرطانی اگزوزوم‌هایی ترشح می‌کنند که ترکیب آن‌ها بسته به ماهیت و شرایط سلول‌ها متفاوت است. افزون بر پروتئین‌های رایج اگزوزومی، این اگزوزوم‌ها حاوی آنتی‌ژن‌های توموری نیز هستند که بازتاب‌دهنده تومورهایی است که از آن‌ها منشأ گرفته‌اند. این اگزوزوم‌ها را می‌توان از مایعات بدن بیماران مبتلا به تومور نیز جداسازی کرد و هر دو حاوی پروتئین‌ها و mRNAهایی با منشأ سلول‌های نئوپلاستیک هستند. با توجه به این ویژگی‌ها، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی به طور گسترده به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص سرطان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.^{۴۹} افزون بر این، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی با بهره‌گیری از ویژگی چسبندگی همولوگ درونی که توسط آنتی‌ژن‌های سطحی غشای آن‌ها میانجی‌گری می‌شود، توانایی هدف‌گیری اختصاصی تومور را نشان می‌دهند. با این حال، کاربردهای بالینی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی به دلیل پاک‌سازی سریع آن‌ها پس از تزریق وریدی محدود شده است. مهم‌تر آن‌که، ترکیبات بیوشیمیایی ذاتی این اگزوزوم‌ها نقشی مستند در تسهیل پیشرفت سرطان دارند؛ از جمله از طریق افزایش

اثرات سودمند شیر مادر در انتروکولیت نکرزوزان، هاک و همکاران تأثیر اگزوزوم‌های مشتق از شیر موش را بر رده سلولی اپی‌تلیال روده (IEC-18) ارزیابی کردند (شکل ۴ A,B,C). به‌منظور انجام آزمون، تعداد $10^4 \times 2$ سلول اپی‌تلیال روده (IEC-18) به‌مدت پنج ساعت با یکی از سه تیمار: $0/5$ میکروگرم بر میکرولیتر اگزوزوم، حجم برابر از شیر فاقد اگزوزوم، یا محلول کنترل (PBS) مورد بررسی قرار گرفتند. زنده‌مانی سلول‌های IEC-18 با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد و بیان ژن نیز با روش qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) تحلیل گردید. با مهار فعال‌سازی گیرنده TLR4 (Toll-like receptor 4) از طریق فاکتور رشد اپیدرمی، مشاهده شد که اگزوزوم‌های مشتق از شیر موش به‌طور معنی‌دار موجب افزایش بقای سلول‌های اپی‌تلیال روده، تقویت تکثیر و تحریک فعالیت سلول‌های بنیادی روده می‌شوند؛ همان‌گونه که در شکل ۴ (F, E, D) نشان داده شده است.^{۴۸} مطالعات مشابه دیگر نیز پتانسیل کاربرد اگزوزوم‌ها را به‌عنوان روشی امیدبخش برای پیشگیری در نوزادانی که در معرض خطر انتروکولیت نکرزوزان هستند، گزارش کرده‌اند.^{۱۳}

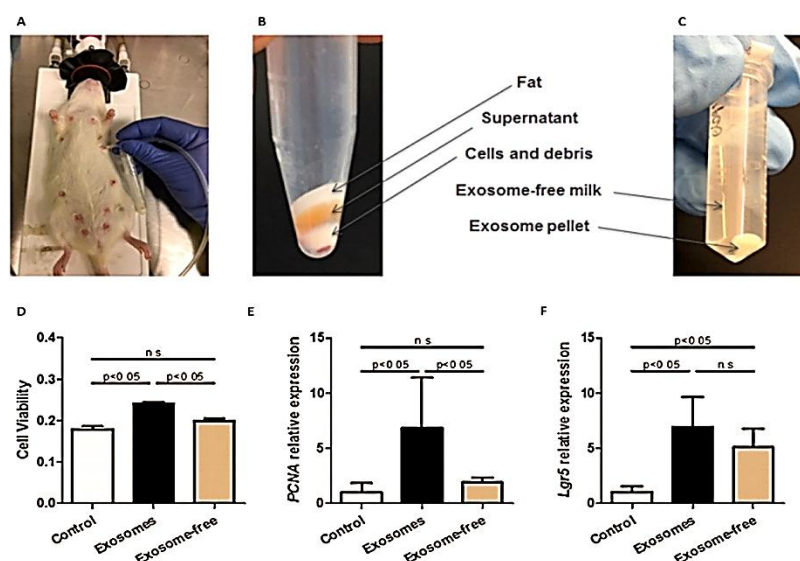
پیشین را تأیید کرد؛ از جمله این‌که اگزوزوم‌های شیر که تولید سیتوکاین القاشده توسط ضد-CD3 را مهار می‌کنند و تعداد سلول‌های T تنظیمی را در نوزادان افزایش می‌دهند، در مراحل اولیه شیردهی به‌طور معنی‌داری بیان می‌شوند.^۶ با توجه به پایداری اگزوزوم‌ها در محیط اسیدی دستگاه گوارش نوزادان، می‌توان حدس زد که اگزوزوم‌های حامل miRNA پس از جذب از روده بر سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارند.

تنظیم رشد سلول‌های اپی‌تلیال

انتروکولیت نکرزوزان (Necrotizing enterocolitis) یک بیماری خطرناک دستگاه گوارش نوزادان است که با التهاب، ایسکمی و انتقال باکتری‌ها به دیواره روده مشخص می‌شود. با شیوعی در حدود $0/5$ تا ۵ مورد در هر ۱۰۰۰ تولد زنده، نوزادان نارس با وزن کم هنگام تولد بیشترین آسیب‌پذیری را دارند. شدت انتروکولیت نکرزوزان می‌تواند از التهاب خفیف روده تا پارگی روده، نارسایی چندسیستمی و مرگ متغیر باشد.^{۴۷} تغذیه نوزادان نارس با شیر مادر با کاهش بروز این بیماری همراه است. برای درک سازوکار زیربنایی



شکل ۳. الگوی بیان miRNAها در شیر مادر بر اساس ریزآرایه miRNA. در بخش (A)، تحلیل خوشه‌ای بیان miRNAهای شیر مادر پیش و پس از دریافت غذای کمکی توسط نوزادان نمایش داده شده است؛ به‌طوری‌که نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ از مادران مختلف تهیه شده‌اند. در بخش (B)، همبستگی سیگنال‌های بیان ژن میان نمونه‌هایی که از یک مادر در شش ماه نخست و شش ماه بعدی جمع‌آوری شده‌اند، نشان داده شده است. این تصویر از منبع^{۴۶} اقتباس شده و تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY) بازنشر شده است.



شکل ۴. جمع‌آوری شیر موش، جداسازی اگزوزوم و اثر آن بر زنده‌مانی سلولی و بیان ژن. در بخش (A) طرح آزمایشی جمع‌آوری شیر از موش نشان داده شده است. در بخش (B)، پس از سانتریفیوژ اولیه، شیر به سه لایه مجزا شامل چربی، سوپرناتانت و سلول‌ها و بقایا تفکیک شده است. در بخش (C)، پلت قابل مشاهده اگزوزوم همراه با شیر عاری از اگزوزوم باقی‌مانده پس از سانتریفیوژ با معرف ExoQuick نشان داده شده است. در بخش‌های (D)، (E) و (F) به ترتیب زنده‌مانی سلول‌های IEC-18 و بیان نسبی نرمال شده ژن‌های PCNA و Lgr5 در سلول‌های تیمار شده با گروه کنترل، اگزوزوم و شیر عاری از اگزوزوم مقایسه شده‌اند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM گزارش شده و مقادیر P کمتر از ۵٪ معنادار در نظر گرفته شده‌اند. این تصویر با کسب اجازه از منبع^{۴۸} اقتباس و باز نشر شده است.

بروز اثر آنتی‌اکسیدانی

پاسخ به استرس اکسیداتیو القاشده با H_2O_2 شد. سازوکار احتمالی این اثر به حضور miR-155 و miR-146a درون اگزوزوم‌ها؛ میکروRNAهایی که NRF2، یک فاکتور رونویسی کلیدی در تنظیم دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی، را هدف قرار می‌دهند، نسبت داده شد.^{۵۰} در مطالعه‌ای مشابه، ابراهیم و همکاران^{۴۹} توانایی اگزوزوم‌های مشتق از شیر شتر غنی از لاکتوفیرین و کازئین‌ها را در کاهش استرس اکسیداتیو القاشده با سیکلوفسفامید در موش‌ها بررسی کردند.

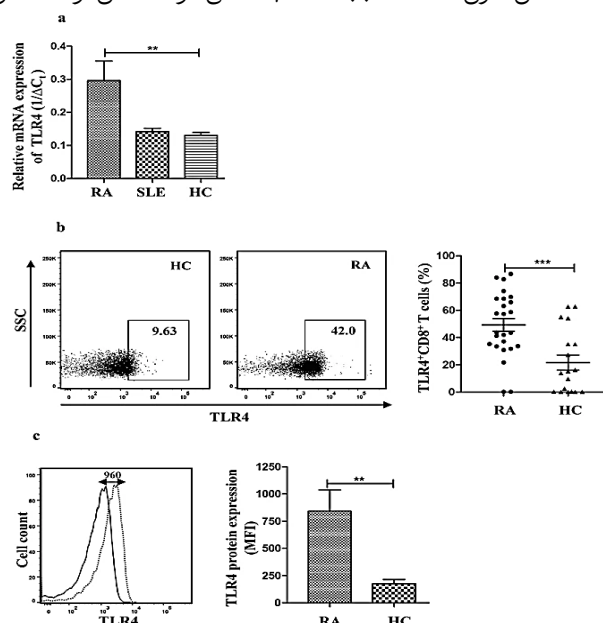
بهبود آرتریت

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis) یک بیماری خودایمنی سیستمیک و مزمن است که با واکنش‌های ایمنی غیرطبیعی علیه آنتی‌ژن‌های خودی مشخص می‌شود و در نتیجه موجب افزایش سیتوکین‌های پیش‌التهابی و اتوآنتی‌بادی‌ها شده و عمدتاً پوشش مفاصل سینوویال را درگیر می‌کند.^{۵۱} هرچند پاتوژنز آرتریت روماتوئید هنوز به‌طور کامل روشن نشده است، اما بروز آن با عوامل ژنتیکی و محیطی ارتباط دارد. درمان‌های دارویی کنونی برای مدیریت این بیماری شامل داروهای ضدروماتیسمی تعدیل‌کننده بیماری به شکل متداول، بیولوژیک و نوین هستند؛ با این حال، نتایج بالینی حاصل از این درمان‌ها همچنان محدودیت‌هایی دارد و رضایت‌بخش نیست.^{۵۲} تربیتی و همکاران افزایش بیان انواع گیرنده‌های TLRs را روی سلول‌های $CD8^+$ T محیطی بیماران مبتلا

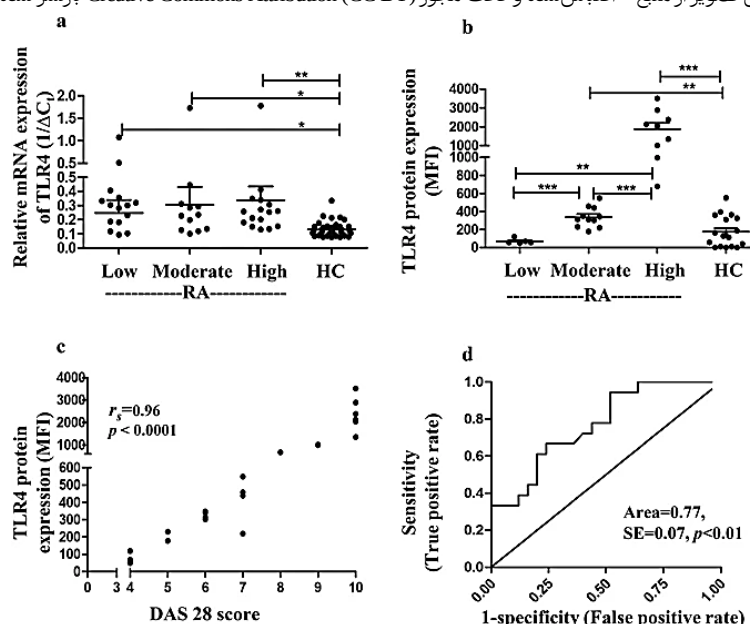
استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و توانایی بدن در خنثی‌سازی اثرات زیان‌بار آن‌ها از طریق آنتی‌اکسیدان‌ها تعریف می‌شود. برهم‌خوردن همئوستازی ناشی از افزایش بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) موجب آسیب سلولی شده و از عوامل اصلی بروز بیماری‌هایی مانند زخم‌های گاستروئودنال، بیماری التهابی روده و سرطان معده/روده بزرگ به‌شمار می‌رود.^{۴۹} وانگ و همکاران اثرات آنتی‌اکسیدانی اگزوزوم‌های مشتق از شیر گاو را در سلول‌های اپی‌تلیال روده با هدف بررسی نقش محافظتی آنها در برابر استرس اکسیداتیو القاشده با H_2O_2 ارزیابی کردند. سلول‌های IEC-6 با تراکم 1×10^3 سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت برای اتصال سلول‌ها نگهداری شدند. سپس اگزوزوم‌ها با غلظت‌های نهایی ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها افزوده شدند. در گروه کنترل، حجم برابری از PBS به جای اگزوزوم استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس برای القای استرس اکسیداتیو، به مدت چهار ساعت در معرض ۱۰۰ میکرومول بر لیتر H_2O_2 قرار گرفتند. پیش تیمار سلول‌های IEC-6 با اگزوزوم‌های مشتق از شیر گاو موجب افزایش معنی‌دار بقای سلولی و نیز افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتینون پراکسیداز در

جهت‌دهی سلول‌های $CD8^+$ T به سمت یک فنوتیپ فعال‌شده و افزایش بیان مولکول‌های التهابی و سیتولیتیک شامل $TNF\alpha$ و $IFN\gamma$ می‌شود؛ همان‌گونه که در شکل ۶ ارایه شده است.^{۵۳}

به آرتریت روماتوئید شناسایی کردند؛ موضوعی که در شکل ۵ نیز نشان داده شده است. آن‌ها نقش قابل‌توجه $TLR4$ را در پاتوژنز و پیشرفت آرتریت روماتوئید تأیید نمودند. فعال‌سازی $TLR4$ سبب



شکل ۵. سلول‌های $CD8^+$ T بیان $TLR4$ را در بیماران آرتریت روماتوئید افزایش می‌دهند. در بخش (A)، بیان نسبی mRNA مربوط به $TLR4$ در سلول‌های $CD8^+$ T محیطی با استفاده از qPCR در ۴۵ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید، ۹ بیمار مبتلا به لوپوس (SLE)، و ۴۲ فرد سالم (HC) اندازه‌گیری شده است. در بخش (B)، یک پائل نمایشی FACS سطح بیان $TLR4$ در سلول‌های $CD8^+$ T فرد سالم و بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید را نشان می‌دهد. در بخش (C)، هیستوگرام توزیع فلورسانس $TLR4$ را در سلول‌های $CD8^+$ T متعلق به فرد سالم و بیمار مقایسه می‌کند. جابه‌جایی شدت فلورسانس نشان‌دهنده افزایش بیان $TLR4$ در سلول‌های $CD8^+$ T بیمار است. خط پیوسته نمایانگر فرد سالم و خط نقطه‌چین نمایانگر بیمار است. این تصویر از منبع^{۵۳} اقتباس شده و تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY) بازنشر شده است.



شکل ۶. بیان $TLR4$ توسط سلول‌های $CD8^+$ T در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در سطوح مختلف فعالیت بیماری. در بخش‌های (A) و (B)، نمودارهای پراکنش بیان mRNA و پروتئین $TLR4$ در سلول‌های $CD8^+$ T افراد سالم (HC) و بیماران را نشان می‌دهند. در بخش (C)، تحلیل همبستگی ناپارامتری اسپیرمن بین بیان پروتئین $TLR4$ (بر اساس MFI) و امتیاز DAS28 نمایش داده شده است. در بخش (D)، تحلیل برای بیان پروتئین $TLR4$ در نمونه‌های مربوط به بیماران و افراد سالم ارائه شده است. این تصویر از منبع^{۵۳} اقتباس شده و تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY) بازنشر شده است.

خوراکی اگزوزوم‌های شیر می‌تواند به‌طور مؤثر مانع از تخریب غضروف در موش‌های مبتلا به آرتروز ناشی از بی‌ثباتی منیسک داخلی (Destabilization of the medial meniscus) شود. به‌طور خاص، اگزوزوم‌های شیر می‌توانند با بازگرداندن تعادل ماتریکس و اصلاح ترکیب میکروبیوتای فلور روده، پیشرفت آرتروز را کاهش دهند. تجویز اگزوزوم‌ها منجر به افزایش نسبت *Firmicutes/Bacteroidetes* منجر می‌شود، که قبلاً مشاهده شده بود به‌طور غیرطبیعی در موش‌های DMM کاهش می‌یابد. علاوه بر این، اگزوزوم‌های شیر منجر به کاهش شیوع باکتری‌های پیش‌التهابی، مانند *Proteobacteria* و *Enterobacteriaceae* و تحریک رشد باکتری‌های بالقوه مفید مانند *Firmicutes*، *Ruminococcaceae* و *Akkermansia* می‌شوند. با این حال، مکانیسم دقیقی که اگزوزوم‌های شیر از طریق آن محور «روده-مفصل» را برای کاهش آرتروز تنظیم می‌کنند، نیاز به بررسی بیشتر دارد.^{۵۶}

بیماری پارکینسون به‌عنوان یک اختلال نورودژنراتیو پیشرونده بوده و در سیستم اکستراپیرامیدال طبقه‌بندی می‌شود. پاتوژن این بیماری شامل مکانیسم‌های مختلفی از جمله تجمع پروتئین‌های بد تاخورد، بروز استرس اکسیداتیو و شروع پاسخ‌های التهابی است. شیوع این پدیده در درجه اول در افراد متعلق به جمعیت میانسال و مسن، به ویژه افراد ۶۵ سال و بالاتر مشاهده می‌شود.^{۵۷} اپیکاتچین گالات (Epicatechin gallate) به عنوان یکی از مؤثرترین کاتچین‌ها شناخته شده است که خواص محافظت عصبی چشم-گیری از خود نشان داده است.^{۵۸} در این راستا، محققان مزایای محافظتی بالقوه پنج کاتچین در برابر مرگ سلولی PC12 را بررسی کردند.^{۵۹} اپیکاتچین گالات در مقایسه با سایر فنول‌ها، مؤثرترین اثر محافظتی را نشان داد. با این وجود، استفاده از اپیکاتچین گالات به‌دلیل ناپایداری ذاتی و ظرفیت محدود آن برای عبور از سد روده که به‌طور بالقوه بر میزان جذب و توزیع آن در سراسر بدن تأثیر می‌گذارد، همچنان محدود است.^{۶۰} دارورسانی یک جنبه حیاتی از پزشکی مدرن است، زیرا دارورسانی هدفمند می‌تواند اثربخشی آن‌ها را افزایش داده و عوارض جانبی ناخواسته را به حداقل برساند. ویژگی‌های منحصر به فرد اگزوزوم‌های شیر مزایای متمایز متعددی را به سیستم‌های دارورسانی از جمله توانایی آن‌ها در انتشار طولانی مدت در بدن در حالت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی و ظرفیت آن‌ها برای طولانی کردن گردش دارو در جریان خون می‌دهد.^{۶۱} از این‌رو در مطالعه‌ای، روشی جدید برای تجویز ECG از طریق اگزوزوم‌های شیر ابداع شد و خواص محافظت عصبی بالقوه آن در یک مدل آزمایشگاهی از بیماری پارکینسون القا شده توسط روتنون (Rot) ارزیابی شد. اگزوزوم‌های بارگذاری شده با ECG (ECG-Exo)

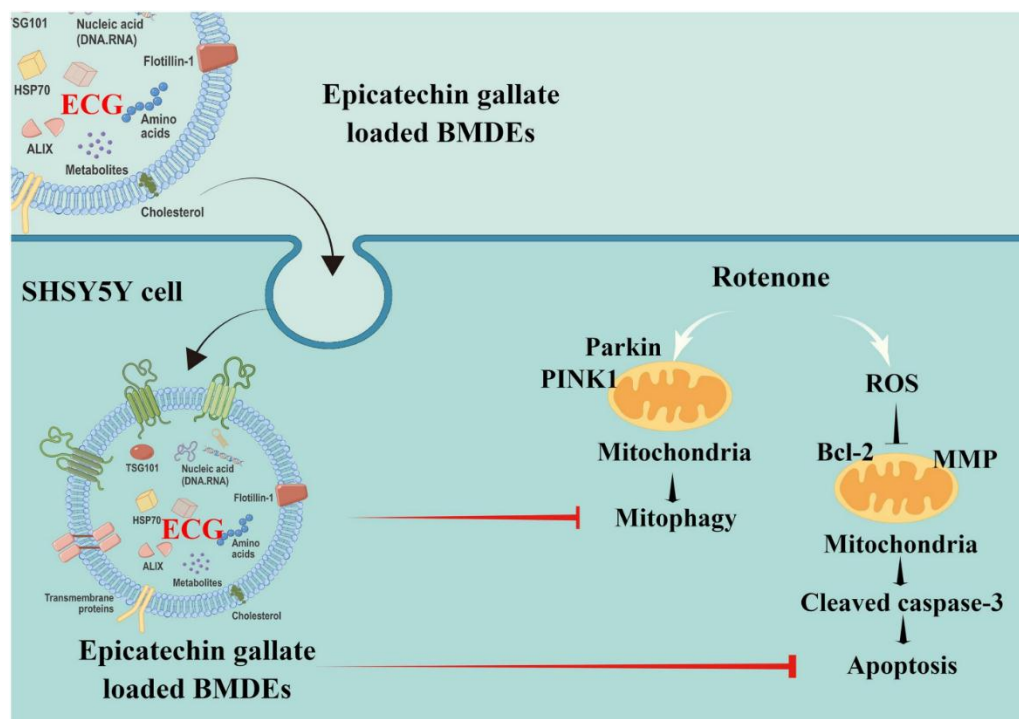
با توجه به نقش تنظیمی شناخته‌شده اگزوزوم‌های مشتق از شیر بر سلول‌های T، آرنزو و همکاران امکان استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از شیر گاو را به‌عنوان درمان آرتريت در مدل‌های موشی فاقد IL-1Ra و مدل آرتريت القا شده با کلاژن بررسی کردند. در موش‌هایی که دوز پایین $10^6 \times 4$ عدد اگزوزوم (حدود $10^6 \times 170$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دریافت کردند، تفاوتی در زمان شروع بیماری و امتیاز ماکروسکوپی مشاهده نشد؛ اما موش‌هایی که دوز بالاتر $10^6 \times 28$ عدد (حدود $10^6 \times 1200$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دریافت کرده بودند، تأخیر قابل توجهی در شروع بیماری و کاهش مشهود تورم مفاصل مچ پا نشان دادند. افزون بر این، در هر دو مدل آرتريت مزمن و مخرب وابسته به سلول T، حفاظت قابل توجهی از غضروف و کاهش التهاب مغز استخوان مشاهده شد. کاهش بیان MCP-1 و KC، IL-6 و CCL2 (CCL2)، پس از درمان با اگزوزوم‌ها نیز نشان‌دهنده اثر مهاري آن‌ها بر ایمنی ذاتی است.^۹

افزایش سلامت استخوان و ماهیچه

پوکی استخوان یکی از تظاهرات قابل توجه پیری استخوان است که بر ساختار اسکلتی در سطح سیستمیک تأثیر می‌گذارد. این بیماری با کاهش توده استخوانی و تخریب ریزساختار بافت استخوان مشخص می‌شود. این امر منجر به افزایش شکنندگی استخوان و افزایش حساسیت به شکستگی می‌شود. شیوع پوکی استخوان در جوامعی با جمعیت رو به رشد سالمندی به سرعت در حال افزایش است.^{۶۲} با این وجود، تحقیقات محدودی در مورد تأثیر اگزوزوم‌های شیر بر تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها انجام شده است. بنابراین، برخی از دانشمندان پتانسیل اگزوزوم‌های شیر را برای القای اثرات ضد پوکی استخوان هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن بررسی کرده‌اند.^{۶۰} در این راستا در مطالعه‌ای پس از دو ماه تجویز خوراکی اگزوزوم‌های شیر، موش‌ها از طریق ترکیب گلوکوکورتیکوئید در معرض القای پوکی استخوان قرار گرفتند. گروه آزمایشی موش‌های تحت درمان با اگزوزوم افزایش قابل توجهی در تراکم مواد معدنی استخوان در مقایسه با گروهی که بدون تیمار اگزوزومی تحت پوکی استخوان ناشی از گلوکوکورتیکوئید قرار گرفتند، نشان دادند. علاوه بر این، موش‌های مبتلا به پوکی استخوان کاهش محتوای لاکتوباسیلی را در میکروبیوتای روده خود نشان دادند. با این حال، تجویز اگزوزوم‌های شیر وسیله‌ای مؤثر برای بازیابی ترکیب میکروبیوتای روده بود. یافته‌ها نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های شیر به‌عنوان عوامل بالقوه برای کاهش پوکی استخوان، افزایش گردش استخوان و جلوگیری از تحلیل استخوان امیدوارکننده هستند.^{۶۰} تحقیقات دیگر نشان داده‌اند که تجویز

مزایای بالقوه اگزوزوم‌های شیر بر پیری و آسیب ناشی از تابش اشعه ماوراء بنفش را می‌توان در سه سلول اصلی پوست (کراتینوسیت‌ها، ملانوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها) بررسی کرد.^{۶۵} تجویز اگزوزوم‌های شیر اثر پیشگیرانه‌ای در برابر تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی در کراتینوسیت‌های اپیدرمی ناشی از تابش اشعه ماوراء بنفش نشان داد. مشاهده شد که اگزوزوم‌ها به‌طور قابل توجهی بر تولید ملانین در ملانوسیت‌های تحریک‌شده با اشعه ماوراء بنفش تأثیر می‌گذارند. این اثر ممکن است خطر اختلالات هایپرپیگماتاسیون پوست ناشی از تشکیل بیش از حد ملانین را کاهش دهد. عملکرد اگزوزوم‌ها بر روی فیبروبلاست‌های پوست انسان نیز منجر به مهار بیان ماتریکس متالوپروتئینازها شد. علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در تکثیر سلولی، همراه با افزایش سنتز کلاژن که یکی از اجزای مهم ماتریکس خارج سلولی پوست است، مشاهده شد.^{۶۶} نتایج نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های شیر از پایداری ساختاری و عملکردی قابل توجهی برخوردارند و این امر آن‌ها را به عنوان عوامل درمانی ذاتی برای درمان پیری پوست و آسیب‌های ناشی از اشعه ماوراء بنفش بسیار امیدوارکننده می‌کند.

توانایی ورود به سلول‌های SHSY5Y القا شده توسط Rot را از طریق اندوسیتوز با واسطه Caveolae دارند. یافته‌ها ثابت کرده‌اند که ECG-Exo در محافظت در برابر تخریب عصبی از طریق ضد آپوپتوز و ضدمیتوفاژی مؤثر است.^{۶۴} (شکل ۷). طراحی و اجرای آزمایش‌های درون‌تنی بیشتری پیشنهاد می‌گردد تا ظرفیت اگزوزوم‌های شیر برای رساندن داروها به محل بیماری‌های مرتبط با سن تأیید شود. پیری پوست چندوجهی است و می‌توان آن را به دو نوع متمایز پیری برون‌زا و پیری درون‌زا طبقه‌بندی کرد. نشانه‌های اصلی پیری شامل تغییرات مورفولوژی و عملکرد سلولی، شلی پوست، کاهش خاصیت ارتجاعی، خشک شدن، افزایش چین و چروک، اختلال در ترشح غدد عرق و غدد چربی و کاهش ظرفیت تنظیم سیستم ایمنی است.^{۶۴} شیر به دلیل محتوای بالای مواد مغذی خود، قرن‌هاست که در مراقبت از پوست و مراقبت‌های بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بازده اگزوزوم‌های شیر از اگزوزوم‌های مشتق از سلول، در صورت استخراج از حجم یکسان، چندین برابر بیشتر است. مزیت بالقوه استفاده از اگزوزوم‌های شیر به عنوان مواد اولیه برای پوست، توانایی آن‌ها در حفظ خواص ساختاری، مکانیکی و عملکردی خود حتی پس از لیوفیلیزاسیون و چرخه‌های مکرر انجماد-ذوب است.



شکل ۷. اثر محافظت‌کنندگی اپی‌کاتچین گالات کپسوله‌شده در اگزوزوم‌های مشتق از شیر گاو به واسطه مهار آپوپتوز و میتوفاژی در برابر بیماری پارکینسون. برای ارزیابی اثر نورومحافظتی، سلول‌های SH-SY5Y القا شده با روتنون (Rot) با اگزوزوم‌های حامل اپی‌کاتچین گالات (ECG-Exo) تیمار شده و با ECG آزاد مقایسه شدند. شاخص‌هایی شامل زنده‌مانی سلولی، تولید ROS، نرخ آپوپتوز و نیز بیان پروتئین‌های Atg5، PINK1، Parkin، Bcl-2، Bax، Caspase-3 اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد اگزوزوم‌های شیر انتقال مؤثر ECG به سلول‌های SH-SY5Y را تسهیل کرده و اثرات نورومحافظتی آن را به واسطه دارا بودن ویژگی‌های ضد آپوپتوزی و ضدمیتوفاژی، افزایش می‌دهند. این تصویر با کسب اجازه از منبع^{۶۳} اقتباس و باز نشر شده است.

دارورسانی عوامل درمانی

تحویل عوامل شیمی درمانی

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه دارورسانی مبتنی بر نانوذرات برای شیمی درمانی، عواملی مانند هزینه بالا و سمیت این سامانه‌ها مانع از بهره‌برداری بالینی آن‌ها شده است. همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، قابلیت اقتصادی و زیست‌سازگاری اگزوزوم‌ها، آن‌ها را به گزینه‌ای بسیار قابل توجه برای تبدیل شدن به پلتفرم نوین دارورسانی تبدیل کرده است. موناگالا و همکاران امکان استفاده از اگزوزوم‌های مشابه اگزوزوم‌های شیر گاو را به عنوان حامل عوامل شیمی درمانی بررسی کردند. بارگذاری داروهای شیمی درمانی (پاکلیتاکسل و دوتاکسل) با مخلوط کردن داروی مورد نظر — حل شده در اتانول یا مخلوط ۱:۱ اتانول و استونیتریل — با سوسپانسیون اگزوزوم به نسبت ۱ به ۹ در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. اگزوزوم‌های حامل داروی شیمی درمانی در مقایسه با داروی آزاد در مطالعات کشت سلولی و نیز در مدل‌های زئوگرافت تومور ریه درون تنی، اثربخشی به طور قابل توجهی بالاتر را نشان دادند. علاوه بر این، افزودن لیگاندهای هدف گیر تومور مانند اسید فولیک، توانایی هدف‌گیری سلول‌های سرطانی را افزایش داده و به کاهش چشمگیر حجم تومور منجر شد. اگزوزوم‌های شیر مقاومت میان‌گونه‌ای مطلوبی نشان داده و هیچ واکنش ایمنی یا التهابی نامطلوبی ایجاد نکردند.^{۳۲} یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های شیر از نظر نوع محموله قابل حمل و نیز توانایی دستیابی به هدف‌گیری تومور از انعطاف‌پذیری بالایی برخوردارند.

در یک گزارش مقایسه‌ای، آگاروال و همکاران استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از شیر را برای تجویز خوراکی عامل شیمی درمانی پاکلیتاکسل (Paclitaxel) به عنوان جایگزینی برای روش‌های رایج تزریق وریدی پیشنهاد کردند؛ رویکردی که موجب افزایش زیست‌فراهمی و کاهش سمیت می‌شود. اگزوزوم‌های حامل PAC از طریق مخلوط کردن ساده محلول PAC (استونیتریل: اتانول به نسبت ۱:۱ حجمی/حجمی) با محلول اگزوزوم تهیه شد، به طوری که غلظت نهایی حلال از ۱۰ درصد تجاوز نکند. این فرمولاسیون پایداری بسیار مطلوبی هنگام نگهداری در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد و حتی در حضور مایعات شبیه‌سازی شده گوارشی نشان داد. در مطالعات رهایش درون کشت گاهی، PAC در PBS با pH برابر ۶/۸، یک الگوی رهایش پایدار تا ۴۸ ساعت ارایه کرد. نکته مهم این است که اگزوزوم‌های حامل PAC پس از تجویز خوراکی، مهار قابل توجه رشد تومور (۶۰٪؛ $P < 0.001$) را در برابر زئوگرافت‌های تومور ریه انسانی در

موش‌های nude نشان دادند؛ اثری که به طور کامل بهتر از درمان با PAC تزریقی داخل صفاقی با همان دوز (۳۱٪) بود.^{۳۷}

تحویل siRNA

درمان ژنی از طریق تداخل RNA، یک پلتفرم درمانی امیدبخش برای درمان دقیق و شخصی‌سازی شده انواع اختلالات کشنده است؛ زیرا این رویکرد قادر است ژن‌های درگیر در بیماری را به صورت توالی‌ویژه هدف قرار دهد. RNAهای مداخله‌گر کوچک (Small interfering RNA) امکان کنترل مؤثر بیان ژن را از طریق برش mRNA یا مهار ترجمه آن فراهم می‌کنند. با وجود پتانسیل درمانی چشمگیر siRNAها، موفقیت بالینی آن‌ها به دلیل نبود سامانه‌های کارآمد برای رساندن به سلول‌های هدف، همچنان محدود است. اگزوزوم‌ها به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد ساختاری، عملکردی و اندازه کوچک خود، به عنوان سامانه‌ای نوظهور برای انتقال درمان‌های زیستی مانند siRNA مطرح شده‌اند. عقیل و همکاران پتانسیل اگزوزوم‌های شیر را به عنوان یک حامل زیست‌سازگار و مقیاس‌پذیر برای تحویل siRNA بررسی کردند. اگزوزوم‌های مشتق از شیر گاو با مجموعه‌ای از siRNAها علیه ژن‌هایی مانند VEGF، AKT، MAPK، KRAS، SUR و BCL2 در انواع مختلف سلول‌های سرطانی از طریق الکتروپوریشن و ترانسفکشن شیمیایی بارگذاری شدند تا فعالیت ضدتوموری اگزوزوم‌های حامل siRNA در مدل زئوگرافت تومور ریه در موش‌های nude ارزیابی شود. برای هدف‌گیری اختصاصی ریزمحیط تومور، سطح اگزوزوم‌ها با اتصال کووالانسی اسید فولیک اصلاح شد. مقدار ۱۰۰ پیکومول از هر siRNA در اگزوزوم‌ها بارگذاری شد و اثر خاموش‌سازی ژن در رده‌های مختلف سلولی سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.^{۳۸} فرمولاسیون‌های حاوی siRNA توانستند ژن‌های هدف را در دامنه‌ای از حدود ۲۰ درصد تا بیش از ۸۰ درصد خاموش کنند. در سلول‌های سرطان ریه، siVEGF و siAKT به ترتیب موجب کاهش بیان ژن‌های هدف به میزان ۸۱ و ۷۶ درصد شدند. siSUR نیز با حدود ۸۰ درصد خاموش‌سازی ژن، کارایی قابل توجهی در سلول‌های سرطان پستان نشان داد. همچنین، siVEGF در سلول‌های سرطان تخمدان مؤثر بوده و توانست حدود ۷۵ درصد از بیان ژن هدف را مهار کند.

افزایش زیست‌فراهمی

کورکومین، یک ترکیب پلی‌فنولی مشتق از زردچوبه است و به دلیل برخورداری از اثرات فارماکولوژیک گسترده از جمله ویژگی‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیری و ضدآنژیوژنز یکی از پرمطالعه‌ترین مواد زیست‌فعال محسوب می‌شود.^{۳۹}

ممکن است تحت نیروی گریز از مرکز شدید و غلظت بالای ساکارز دچار تغییر یا آسیب شود. علاوه بر این، در ارزیابی‌های مربوط به پایداری اگزوزوم‌های شیر، تفاوت‌های آشکاری در شاخص‌های اندازه‌گیری (Endpoints) دیده می‌شود. بسیاری از مطالعات، پایداری اگزوزوم‌ها در برابر حرارت (مانند دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) یا شرایط هضم مصنوعی را صرفاً بر اساس شناسایی سیگنال‌های miRNA بررسی کرده‌اند. این رویکرد واجد این محدودیت ساختاری است که بقای اسیدهای نوکلئیک لزوماً به معنای یکپارچگی غشای اگزوزوم، حفظ مورفولوژی اولیه، بقای پروتئین‌های سطحی مانند CD9، CD63 و CD81 و در نهایت حفظ عملکرد زیستی ذرات در سلول‌های هدف نیست.

علی‌رغم تأیید پایداری نسبی اگزوزوم‌های شیر در سیستم‌های شبیه‌سازی‌شده گوارشی (درون‌تنی و برون‌تنی)، مکانیسم‌های دقیق ترابری این ذرات از سدهای اپیتلیال روده و چگونگی محافظت از محموله درون سلولی آن‌ها هنوز به‌طور کامل رمزگشایی نشده است. ابهاماتی نظیر نقش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های غشایی اگزوزوم در بقای گوارشی و برهم‌کنش با گیرنده‌های سلول‌های میزبان وجود دارد که نیازمند مطالعات مکانیسمی دقیق‌تر است. همچنین، مشخص نیست که آیا تغییرات فیزیولوژیک مادر (نظیر وضعیت تغذیه، استرس و بیماری‌ها) یا فرآیندهای صنعتی آماده‌سازی شیر (پاستوریزاسیون و هموژنیزاسیون) تا چه حد بر پروفایل محموله‌های اگزوزومی به‌ویژه RNAهای غیرکدکننده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها تأثیر منفی می‌گذارند.

انتخاب منبع اگزوزوم نقشی تعیین‌کننده در توسعه درمان‌های مبتنی بر بدون سلول دارد. مقایسه اگزوزوم‌های مشتق از شیر با اگزوزوم‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مایعات زیستی انسانی (خون و ادرار) مزایا و معایب متمایزی را نشان می‌دهد، از جمله دسترسی و مقیاس‌پذیری؛ شیر به‌عنوان یک منبع طبیعی، ارزان‌قیمت، در دسترس و با حجم تولید بسیار بالا شناخته می‌شود؛ در حالی که استخراج اگزوزوم از سلول‌های بنیادی مستلزم فرآیندهای پرهزینه کشت سلولی، مصرف فاکتورهای رشد و محیط‌های کشت اختصاصی است به لحاظ ایمنی و زیست‌سازگاری نیز اگزوزوم‌های شیر سمیت سلولی بسیار پایینی نشان می‌دهند و به‌دلیل ترجیح خوراکی، پذیرش بهتری در سیستم گوارشی دارند. با این حال، خطر پاسخ‌های ایمنی ناشی از پروتئین‌های ناخواسته شیر (به‌ویژه در نمونه‌های غیرهمسو از نظر گونه‌ای مانند شیر گاو برای انسان) یا انتقال عوامل بیماری‌زای مشترک میان انسان و دام همچنان یک دغدغه است، در حالی‌که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی خودی (Autologous) ایمنی بالاتری دارند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کورکومین حتی در دوزهای بالا (۱۲ گرم در روز) ایمن است، اما زیست‌فراهمی بسیار پایینی دارد. جذب اندک، متابولیسم سریع و حذف سیستمیک زودهنگام ازجمله عواملی هستند که به سطح پایین پلاسمایی و بافتی کورکومین منجر می‌شوند.^{۲۰} در یک مطالعه، عقیل و همکاران امکان استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از شیر را برای رسانش کارآمد کورکومین بررسی کردند. ترکیب دارو با اگزوزوم‌های جداشده منجر به بارگذاری ۱۸ تا ۲۴ درصدی کورکومین شد. تجویز خوراکی کورکومین اگزوزومی در موش‌های Sprague-Dawley موجب افزایش سه تا پنج برابری سطح کورکومین در اندام‌های مختلف شد و همچنین فعالیت ضدتکثیر بر جسته‌ای در برابر چندین رده سلولی سرطانی از جمله سرطان پستان، ریه و دهانه رحم نسبت به کورکومین آزاد نشان داد. در حالی که مصرف خوراکی کورکومین آزاد هیچ اثری ایجاد نکرد، اگزوزوم‌های حامل کورکومین موجب مهار خفیف رشد تومور (حدود ۲۵ تا ۳۰٪) در موش‌های nude حامل زئوگرافت تومور دهانه رحم CaSki شدند. علاوه بر این، کورکومین اگزوزومی هیچ‌گونه سمیت سیستمیک یا بافتی قابل مشاهده‌ای ایجاد نکرد. این نتایج نشان می‌دهد که توانایی ذاتی اگزوزوم‌های شیر در برهم‌کنش با سلول‌ها می‌تواند برای افزایش زیست‌فراهمی داروهای تجویز شده خارجی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.^{۲۱}

بحث

با وجود رشد روزافزون پژوهش‌های مرتبط با اگزوزوم‌های مشتق از شیر و پتانسیل بالای آن‌ها به‌عنوان ناقل‌های زیستی نوین و بیومارکرهای سلامت، تحلیل انتقادی ادبیات تحقیق نشان می‌دهد که این حوزه همچنان با چالش‌های روش‌شناختی، ساختاری و بالینی متعددی روبرو است. در این بخش، ابعاد مختلف این چالش‌ها در قالب چهار محور اساسی مورد واکاوی قرار می‌گیرد. یکی از چالش‌های بنیادین در پژوهش‌های مرور شده، وجود ناهمگونی شدید در پروتکل‌های جداسازی، خالص‌سازی و مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها است. عدم وجود یک رویه استاندارد بین‌المللی موجب شده است که مقایسه داده‌های مربوط به خلوص، بازده و محتوای بیولوژیک اگزوزوم‌ها بین آزمایشگاه‌های مختلف با دشواری و عدم قطعیت همراه باشد. به‌عنوان مثال، در روش‌های مبتنی بر سانتریفیوژ تفاضلی، ناخالصی‌های پروتئینی (مانند کازئین و پروتئین‌های آب‌پنیر) و وزیکول‌های غیراگزوزومی به‌وفور هم‌رسوب می‌شوند، در حالی‌که در روش‌های مبتنی بر گرادیان چگالی، با وجود دستیابی به خلوص بالا، ساختار فیزیکی وزیکول‌ها

همچنین، از بعد هدفمندی در درمان نیز اگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی به‌طور ذاتی تمایل به مهاجرت به بافت‌های آسیب‌دیده یا ملتهب دارند؛ ویژگی که در اگزوزوم‌های خام شیر بدون مهندسی ژنتیک یا شیمیایی غشا کمتر دیده می‌شود.

در کنار این چالش‌ها، امکان تجاری‌سازی اگزوزوم‌های مشتق از شیر مطابق با الزامات شرایط تولید مطلوب (Good manufacturing practice) همزمان یک فرصت ارزشمند و یک چالش مهم محسوب می‌شود. ایجاد یک منبع پایدار و یکنواخت برای استخراج اگزوزوم‌ها، به‌کارگیری سامانه‌های قدرتمند و قابل‌اعتماد برای خالص‌سازی و اجرای راهکارهای مؤثر کنترل کیفیت سه محور اساسی برای تحقق الزامات شرایط تولید مطلوب هستند. همان‌گونه که اشاره شد، به‌جز شیر انسان، تمامی منابع بالقوه اگزوزوم‌های مشتق از شیر را می‌توان به‌دلیل وجود صنایع گسترده و سازمان‌یافته دامداری و لبنیات، در مقیاس صنعتی تأمین کرد. تأثیر تغذیه و جیره خوراکی دام بر یکنواختی و ویژگی‌های ترکیبی شیر را نیز می‌توان از طریق یکپارچه‌سازی و اجرای دقیق برنامه‌های تغذیه مهار یا حذف کرد.^{۲۲} پس از جداسازی اولیه اگزوزوم‌ها از شیر خام با استفاده از روش‌های مطرح‌شده، خالص‌سازی دقیق برای حذف ناخالصی‌هایی مانند اجسام آبیوتوتیک، میکرووزیکول‌ها، بار ویروسی و اندوتوکسین‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. اخیراً تأکید زیادی بر ترکیب فیلتراسیون جریان مماسی (Tangential flow filtration) با اولتراسانتریفیوژ یا کروماتوگرافی حذف اندازه برای دستیابی به خالص‌سازی در مقیاس بزرگ شده است.^{۲۳} اگزوزوم‌هایی که قرار است به‌عنوان حامل دارو استفاده شوند، پس از خالص‌سازی، مراحل بارگذاری عامل درمانی را طی می‌کنند. در نهایت، محصول نهایی از چندین مرحله کنترل کیفی عبور می‌کند تا از وجود ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و زیستی مطلوب اطمینان حاصل شود. به‌طور کلی، گرچه مسیر بهره‌برداری صنعتی و بالینی از اگزوزوم‌های مشتق از شیر با چالش‌هایی همراه است، اما فرصت‌های گسترده‌ای نیز پیش رو قرار دارد که می‌تواند این نانوزیست اگزوزوم‌های طبیعی را به یکی از پلتفرم‌های کلیدی دارورسانی در آینده تبدیل کند.

همچنین، از بعد هدفمندی در درمان نیز اگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی به‌طور ذاتی تمایل به مهاجرت به بافت‌های آسیب‌دیده یا ملتهب دارند؛ ویژگی که در اگزوزوم‌های خام شیر بدون مهندسی ژنتیک یا شیمیایی غشا کمتر دیده می‌شود.

در کنار این چالش‌ها، امکان تجاری‌سازی اگزوزوم‌های مشتق از شیر مطابق با الزامات شرایط تولید مطلوب (Good manufacturing practice) همزمان یک فرصت ارزشمند و یک چالش مهم محسوب می‌شود. ایجاد یک منبع پایدار و یکنواخت برای استخراج اگزوزوم‌ها، به‌کارگیری سامانه‌های قدرتمند و قابل‌اعتماد برای خالص‌سازی و اجرای راهکارهای مؤثر کنترل کیفیت سه محور اساسی برای تحقق الزامات شرایط تولید مطلوب هستند. همان‌گونه که اشاره شد، به‌جز شیر انسان، تمامی منابع بالقوه اگزوزوم‌های مشتق از شیر را می‌توان به‌دلیل وجود صنایع گسترده و سازمان‌یافته دامداری و لبنیات، در مقیاس صنعتی تأمین کرد. تأثیر تغذیه و جیره خوراکی دام بر یکنواختی و ویژگی‌های ترکیبی شیر را نیز می‌توان از طریق یکپارچه‌سازی و اجرای دقیق برنامه‌های تغذیه مهار یا حذف کرد.^{۲۲} پس از جداسازی اولیه اگزوزوم‌ها از شیر خام با استفاده از روش‌های مطرح‌شده، خالص‌سازی دقیق برای حذف ناخالصی‌هایی مانند اجسام آبیوتوتیک، میکرووزیکول‌ها، بار ویروسی و اندوتوکسین‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. اخیراً تأکید زیادی بر ترکیب فیلتراسیون جریان مماسی (Tangential flow filtration) با اولتراسانتریفیوژ یا کروماتوگرافی حذف اندازه برای دستیابی به خالص‌سازی در مقیاس بزرگ شده است.^{۲۳} اگزوزوم‌هایی که قرار است به‌عنوان حامل دارو استفاده شوند، پس از خالص‌سازی، مراحل بارگذاری عامل درمانی را طی می‌کنند. در نهایت، محصول نهایی از چندین مرحله کنترل کیفی عبور می‌کند تا از وجود ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و زیستی مطلوب اطمینان حاصل شود. به‌طور کلی، گرچه مسیر بهره‌برداری صنعتی و بالینی از اگزوزوم‌های مشتق از شیر با چالش‌هایی همراه است، اما فرصت‌های گسترده‌ای نیز پیش رو قرار دارد که می‌تواند این نانوزیست اگزوزوم‌های طبیعی را به یکی از پلتفرم‌های کلیدی دارورسانی در آینده تبدیل کند.

روش‌های الایزا و الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات برای تعیین و کمی‌سازی محتوای پروتئینی اگزوزوم‌ها به‌کار گرفته می‌شوند.^{۲۴} افزون بر این، آنالایزرهای الکتروفورز میکروسیالی (Microfluidic electrophoresis analyzer) و کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی به‌عنوان روش‌های استاندارد برای تحلیل اجزای تشکیل‌دهنده اگزوزوم‌ها شناخته شده‌اند.^{۲۵} پروتئین‌های سیتوزولی و نشانگرهای اختصاصی اگزوزومی (مانند

در زمینه موانع قانونی و ایمنی نیز سازمان‌های نظارتی مانند FDA (Food and Drug Administration) و EMA (European Medicines Agency) هنوز چارچوب قانونی مشخصی برای تأیید فرآورده‌های دارویی حاوی اگزوزوم‌های مشتق از شیر دام تعریف نکرده‌اند. تعیین دوز دقیق درمانی، بررسی سمیت مزمن، فراهمی زیستی دقیق پس از مصرف خوراکی و پایداری در نگهداری طولانی‌مدت (بدون نیاز به فریزرهای فوق سرد) از پیش‌نیازهای دریافت مجوزهای بالینی است. در مجموع، رفع این چالش‌ها مستلزم طراحی مطالعات بین‌رشته‌ای با تمرکز بر فرمولاسیون‌های پایدار، مهندسی سطح اگزوزوم‌ها برای افزایش هدفمندی، و تدوین پروتکل‌های یکپارچه جداسازی در مقیاس نیمه‌صنعتی خواهد بود.

نتیجه‌گیری

اگزوزوم‌های مشتق از شیر توانایی عبور از سد‌های زیستی و ورود به سلول‌ها را نشان داده‌اند؛ پس از ورود، این وزیکول‌ها می‌توانند محتوای خود را آزاد کرده و عملکردهای سلولی سلول‌های گیرنده را تنظیم کنند. این مطالعه، منابع قابل‌استفاده، رویکردهای جداسازی، مشخصه‌یابی پروتئومیک و پویایی پایداری اگزوزوم‌های مشتق از شیر و همچنین کاربردهای آن‌ها را از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار داد. وجود ذرات آلاینده خارجی، درشت‌مولکول‌های اختصاصی سلولی (پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک) و سایر اجزای سلولی می‌تواند به‌شدت بر خلوص اگزوزوم‌های استخراج‌شده تأثیر بگذارد. از این‌رو، استفاده از تکنیک‌های جداسازی قوی و قابل‌تکرار برای دستیابی به

مشارکت پدیدآوران

امین عباسی: ایده‌پردازی، طراحی ساختار کلی مقاله، هماهنگی کلیه مراحل تدوین و تأیید نسخه نهایی؛ هادی قنبری: همکاری در روش‌شناسی، تدوین محتوا و مشارکت در ویرایش نهایی؛ محمد علی تربتی: همکاری در نگارش و تهیه نسخه نهایی پیش‌نویس مقاله؛ پارمیس میرزائی: همکاری در جستجوی نظام‌مند منابع علمی، تدوین محتوا و مشارکت در ویرایش نهایی؛ لیلی عاقبتی ملکی: ایده‌پردازی، طراحی ساختار، بازنگری ساختاری، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و همکاری در نگارش و تهیه نسخه نهایی پیش‌نویس مقاله را بر عهده داشته‌اند. همچنین، تمامی نویسندگان در نگارش مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی را مطالعه و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

این پژوهش حامی مالی نداشته است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

هم‌رسانی داده‌ها در این مقاله مورد ندارد، زیرا هیچ داده‌ای در طول مطالعه فعلی تولید نشده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله یک مطالعه مروری است و شامل هیچ‌گونه پژوهش بر روی انسان یا حیوان نمی‌شود؛ بنابراین نیاز به دریافت کد اخلاق نداشته است. کلیه منابع با رعایت اصول امانت‌داری، به صورت علمی و مطابق با موازین اخلاق نشر ارجاع داده شده‌اند.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله ندارند.

اگزوزوم‌های با خلوص بالا ضروری است. سانتریفیوژ تفاضلی، اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی، کروماتوگرافی مایع حذف اندازه و رسوب‌دهی ExoQuick از جمله روش‌های رایجی هستند که برای جداسازی اگزوزوم‌ها از نمونه‌های شیر به کار گرفته می‌شوند. درک فرآیند زیست‌تولید و اثرات سلولی اگزوزوم‌ها از طریق فهرست‌برداری پروتئومیکس اگزوزوم‌ها و محموله درونی آن‌ها امکان‌پذیر است. پروتئین‌ها، mRNA، miRNA و لیپیدها از اجزای اصلی موجود در اگزوزوم‌ها به شمار می‌روند و تعیین مقدار مستقیم پپتیدها و پروتئین‌ها بر پایه توان تفکیک LC-MS/MS به‌طور گسترده به‌عنوان رویکردی مؤثر در پروتئومیکس اگزوزومی به کار گرفته شده است. به‌طور کلی، اگزوزوم‌ها توانایی محافظت از محموله خود را در برابر تخریب توسط مایعات مختلف زیستی دارند؛ از این رو، پایداری آن‌ها در شرایط دمایی متفاوت و در محیط‌های زیستی گوناگون، از جمله محیط‌های شبیه‌سازی شده هضم معده‌ای و پانکراسی، مورد بررسی پژوهشگران قرار گرفته است. اگزوزوم‌های مشتق از شیر کاربردهای متعددی در حوزه‌های مختلف بالینی داشته و می‌توانند به‌عنوان اجزای ذاتی زیست‌فعال عمل کنند که از آن موارد می‌توان به تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی نوزادان، تنظیم رشد سلول‌های اپی‌تلیال، ایفای نقش آنتی‌اکسیدانی و بهبود آرتریت اشاره نمود. افزون بر این، این اگزوزوم‌ها به‌عنوان سامانه‌های نوین دارورسانی برای عوامل درمانی مختلف، از جمله داروهای شیمی‌درمانی و miRNA، و نیز به‌عنوان افزایش‌دهنده زیست‌فراهمی طیف وسیعی از ترکیبات درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که مجموعاً پتانسیل بالای آن‌ها را در تحقیقات پیش‌بالینی و توسعه راهبردهای نوین درمانی نشان می‌دهد.

قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز که بستر این مطالعه را فراهم نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

References

- Shafiee-Kandjani AR, Hosseini L, Karimipour M, Seyedaghamiri F, Sambrani R. Blood and brain exosomes as biomarkers for schizophrenia diagnosis: a systematic review. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences*. 2026;47(6):602-17. doi: 10.34172/mj.026.35137.
- Lin Y, Lu Y, Li X. Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents. *Journal of Drug Targeting*. 2020;28(2):129-41. doi: 10.1080/1061186x.2019.1641508.
- Kulkarni B, Kirave P, Gondaliya P, Jash K, Jain A, Tekade RK, et al. Exosomal miRNA in chemoresistance, immune evasion, metastasis and progression of cancer. *Drug Discovery Today*. 2019;24(10):2058-67. doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.010.
- Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS. Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:361. doi: 10.3389/fimmu.2018.00361.
- Zempleni J, Sukreet S, Zhou F, Wu D, Mutai E. Milk-

- derived exosomes and metabolic regulation. Annual review of animal biosciences. 2019;7(1):245-62. doi: 10.1146/annurev-animal-020518-115300.
6. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. The Journal of immunology. 2007;179(3):1969-78. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1969.
 7. Gao R, Zhang R, Qian T, Peng X, He W, Zheng S, et al. A comparison of exosomes derived from different periods breast milk on protecting against intestinal organoid injury. Pediatric Surgery International. 2019;35(12):1363-8. doi: 10.1007/s00383-019-04562-6.
 8. Näslund TI, Paquin-Proulx D, Paredes PT, Vallhov H, Sandberg JK, Gabrielsson S. Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. Aids. 2014;28(2):171-80. doi: 10.1097/qad.000000000000159.
 9. Arntz OJ, Pieters BC, Oliveira MC, Broeren MG, Bennink MB, de Vries M, et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. Molecular nutrition & food research. 2015;59(9):1701-12. doi: 10.1002/mnfr.201500222.
 10. Li B, Hock A, Wu RY, Minich A, Botts SR, Lee C, et al. Bovine milk-derived exosomes enhance goblet cell activity and prevent the development of experimental necrotizing enterocolitis. PLoS One. 2019 Jan 30;14(1):e0211431. doi: 10.1371/journal.pone.0211431.
 11. Samuel M, Chisanga D, Liem M, Keerthikumar S, Anand S, Ang CS, et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. Sci Rep. 2017;7(1):5933. doi: 10.1038/s41598-017-06288-8.
 12. Chen T, Xie MY, Sun JJ, Ye RS, Cheng X, Sun RP, et al. Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells. Sci Rep. 2016;6:33862. doi: 10.1038/srep33862.
 13. Badawy AA, El-Magd MA, AlSadrah SA. Therapeutic Effect of Camel Milk and Its Exosomes on MCF7 Cells In Vitro and In Vivo. Integr Cancer Ther. 2018;17(4):1235-46. doi: 10.1177/1534735418786000.
 14. Ibrahim HM, Mohammed-Geba K, Tawfic AA, El-Magd MA. Camel milk exosomes modulate cyclophosphamide-induced oxidative stress and immuno-toxicity in rats. Food Funct. 2019;10(11):7523-32. doi: 10.1039/c9fo01914f.
 15. Gao HN, Guo HY, Zhang H, Xie XL, Wen PC, Ren FZ. Yak-milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in an hypoxic environment. J Dairy Sci. 2019;102(2):985-96. doi: 10.3168/jds.2018-14946.
 16. Yamauchi M, Shimizu K, Rahman M, Ishikawa H, Takase H, Ugawa S, et al. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. Drug Dev Ind Pharm. 2019;45(3):359-64. doi: 10.1080/03639045.2018.1539743.
 17. Desai N, Gadeval A, Kathar U, Sengupta P, Kalia K, Tekade RK. Emerging roles and biopharmaceutical applications of milk derived exosomes. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2021;64:102577. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102577.
 18. 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;5:17319. doi: 10.1038/srep17319.
 19. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. Methods Mol Biol. 2015;1295:179-209. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15.
 20. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. Biol Chem. 2013;394(10):1253-62. doi: 10.1515/hsz-2013-0141.
 21. Blans K, Hansen MS, Sørensen LV, Hvam ML, Howard KA, Möller A, et al. Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. J Extracell Vesicles. 2017;6(1):1294340. doi: 10.1080/20013078.2017.1294340.
 22. Ding M, Wang C, Lu X, Zhang C, Zhou Z, Chen X, et al. Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. Anal Bioanal Chem. 2018;410(16):3805-14. doi: 10.1007/s00216-018-1052-4.
 23. Bickmore DC, Miklavcic JJ. Characterization of Extracellular Vesicles Isolated From Human Milk Using a Precipitation-Based Method. Front Nutr. 2020;7:22. doi: 10.3389/fnut.2020.00022.
 24. Yang M, Song D, Cao X, Wu R, Liu B, Ye W, et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. Food research international. 2017;92:17-25. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.041.
 25. Greening DW, Xu R, Gopal SK, Rai A, Simpson RJ. Proteomic insights into extracellular vesicle biology - defining exosomes and shed microvesicles. Expert Rev Proteomics. 2017;14(1):69-95. doi: 10.1080/14789450.2017.1260450.
 26. Reinhardt TA, Lippolis JD, Nonnecke BJ, Sacco RE. Bovine milk exosome proteome. J Proteomics.

- 2012;75(5):1486-92. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.017.
27. Chen T, Xi QY, Sun JJ, Ye RS, Cheng X, Sun RP, et al. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):101. doi: 10.1186/s12917-017-1021-8.
 28. Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic & biomolecular chemistry*. 2015;13(38):9775-82. doi: 10.1039/c5ob01451d.
 29. Liao Y, Du X, Li J, Lönnardal B. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular nutrition & food research*. 2017;61(11):1700082. doi: 10.1002/mnfr.201700082.
 30. Rani P, Vashisht M, Golla N, Shandilya S, Onteru SK, Singh D. Milk miRNAs encapsulated in exosomes are stable to human digestion and permeable to intestinal barrier in vitro. *Journal of Functional Foods*. 2017;34:431-9. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.009.
 31. Baddela VS, Nayan V, Rani P, Onteru SK, Singh D. Physicochemical biomolecular insights into buffalo milk-derived nanovesicles. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016;178(3):544-57. doi: 10.1007/s12010-015-1893-7.
 32. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer letters*. 2016;371(1):48-61. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
 33. Kenari AN, Cheng L, Hill AF. Methods for loading therapeutics into extracellular vesicles and generating extracellular vesicles mimetic-nanovesicles. *Methods*. 2020;177:103-13. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.01.001.
 34. Meng W, He C, Hao Y, Wang L, Li L, Zhu G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug delivery*. 2020;27(1):585-98. doi: 10.1080/10717544.2020.1748758.
 35. Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:82-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.03.001.
 36. Joo HS, Suh JH, Lee HJ, Bang ES, Lee JM. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):727. doi: 10.3390/ijms21030727.
 37. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(3):336-41. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.001.
 38. Kharazih P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2012;1826(1):103-11. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.006.
 39. Whiteside TL. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. Expert review of molecular diagnostics. 2015;15(10):1293-310. doi: 10.1586/14737159.2015.1071666.
 40. Sun W, Luo JD, Jiang H, Duan DD. Tumor exosomes: a double-edged sword in cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(4):534-41. doi: 10.21203/rs.3.rs-3273538/v1.
 41. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1440132. doi: 10.1080/20013078.2018.1440132.
 42. Carobolante G, Mantaj J, Ferrari E, Vllasaliu D. Cow milk and intestinal epithelial cell-derived extracellular vesicles as systems for enhancing oral drug delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):226. doi: 10.3390/pharmaceutics12030226.
 43. Li D, Yao S, Zhou Z, Shi J, Huang Z, Wu Z. Hyaluronan decoration of milk exosomes directs tumor-specific delivery of doxorubicin. *Carbohydrate Research*. 2020;493:108032. doi: 10.1016/j.carres.2020.108032.
 44. Manca S, Upadhyaya B, Mutai E, Desaulniers AT, Cederberg RA, White BR, et al. Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Scientific reports*. 2018;8(1):11321. doi: 10.1038/s41598-018-29780-1.
 45. Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:72-81. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009.
 46. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. 2010;1(1):7. doi: 10.1186/1758-907x-1-7.
 47. Niño DF, Sodhi CP, Hackam DJ. Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(10):590-600. doi: 10.1038/nrgastro.2016.119.
 48. Hock A, Miyake H, Li B, Lee C, Ermini L, Koike Y, et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *Journal of pediatric surgery*. 2017;52(5):755-9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.01.032.
 49. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*. 2014;94(2):329-54. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.
 50. Wang L, Shi Z, Wang X, Mu S, Xu X, Shen L, Li P. Protective effects of bovine milk exosomes against oxidative stress in IEC-6 cells. *European journal of*

- nutrition. 2021;60(1):317-27. doi: 10.1007/s00394-020-02242-z.
51. Nolla JM, Valencia-Muntalà L, Berbel-Arcobé L, Benavent D, Vidal-Montal P, Aguilar-Coll M, et al. SARC-F as a screening tool in rheumatoid arthritis: real-world burden of sarcopenia risk, sex differences, and clinical correlates. *Journal of Clinical Medicine*. 2025;14(21):7751. doi: 10.20944/preprints202510.0501.v1.
 52. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res*. 2018;6:15. doi: 10.1038/s41413-018-0016-9.
 53. Tripathy A, Khanna S, Padhan P, Smita S, Raghav S, Gupta B. Direct recognition of LPS drive TLR4 expressing CD8+ T cell activation in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific reports*. 2017;7(1):933. doi: 10.1038/s41598-017-01033-7.
 54. Yu B, Wang CY. Osteoporosis and periodontal diseases—An update on their association and mechanistic links. *Periodontology* 2000. 2022;89(1):99-113. doi: 10.1111/prd.12422.
 55. Yun B, Maburutse BE, Kang M, Park MR, Park DJ, Kim Y, Oh S. Dietary bovine milk-derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model. *Journal of dairy science*. 2020;103(9):7752-60. doi: 10.3168/jds.2019-17501.
 56. Liu Q, Hao H, Li J, Zheng T, Yao Y, Tian X, et al. Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles attenuates cartilage degeneration via modulating gut microbiota in DMM-induced mice. *Nutrients*. 2023;15(3):747. doi: 10.3390/nu15030747.
 57. Weintraub D, Aarsland D, Chaudhuri KR, Dobkin RD, Leentjens AF, Rodriguez-Violante M, et al. The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges. *The Lancet Neurology*. 2022;21(1):89-102. doi: 10.1016/s1474-4422(21)00330-6.
 58. Xu YQ, Gao Y, Granato D. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. *Food chemistry*. 2021;339:128060. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128060.
 59. Jin CF, Shen SR, Zhao BL. Different effects of five catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(12):6033-8. doi: 10.1021/jf010903r.
 60. Granja A, Vieira AC, Chaves LL, Nunes C, Neves AR, Pinheiro M, et al. Folate-targeted nanostructured lipid carriers for enhanced oral delivery of epigallocatechin-3-gallate. *Food chemistry*. 2017;237:803-10. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.019.
 61. del Pozo-Acebo L, López De Las Hazas MC, Tomé-Carneiro J, Gil-Cabrero P, San-Cristobal R, Busto R, et al. Bovine milk-derived exosomes as a drug delivery vehicle for miRNA-based therapy. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(3):1105. doi: 10.3390/ijms22031105.
 62. Luo S, Sun X, Huang M, Ma Q, Du L, Cui Y. Enhanced neuroprotective effects of epicatechin gallate encapsulated by bovine milk-derived exosomes against Parkinson's disease through antiapoptosis and autophagy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2021;69(17):5134-43. doi: 10.1021/acs.jafc.0c07658.
 63. Meng Y, Sun J, Zhang G, Yu T, Piao H. Unlock the power of bovine milk-derived exosomes for degenerative diseases associated with aging. *Journal of Functional Foods*. 2023;109:105788. doi: 10.1016/j.jff.2023.105788.
 64. Ge Y, Miao Y, Gur-Cohen S, Gomez N, Yang H, Nikolova M, et al. The aging skin microenvironment dictates stem cell behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(10):5339-50. doi: 10.1073/pnas.1901720117.
 65. Han G, Cho H, Kim H, Jang Y, Jang H, Kim DE, et al. Bovine colostrum derived-exosomes prevent dextran sulfate sodium-induced intestinal colitis via suppression of inflammation and oxidative stress. *Biomaterials science*. 2022;10(8):2076-87. doi: 10.1039/d1bm01797g.
 66. Han G, Kim H, Kim DE, Ahn Y, Kim J, Jang YJ, et al. The potential of bovine colostrum-derived exosomes to repair aged and damaged skin cells. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):307. doi: 10.3390/pharmaceutics14020307.
 67. Agrawal AK, Aqil F, Jeyabalan J, Spencer WA, Beck J, Gachuki BW, et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017;13(5):1627-36. doi: 10.1016/j.nano.2017.03.001.
 68. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Agrawal AK, Kyakulaga AH, Wilcher SA, et al. Milk exosomes-Natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer letters*. 2019;449:186-95. doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.011.
 69. Dei Cas M, Ghidoni R. Dietary curcumin: correlation between bioavailability and health potential. *Nutrients*. 2019;11(9):2147. doi: 10.3390/nu11092147.
 70. Jamwal R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. *Journal of integrative medicine*. 2018;16(6):367-74. doi: 10.1016/j.joim.2018.07.001.
 71. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Agrawal AK, Gupta R. Exosomes for the enhanced tissue bioavailability and efficacy of curcumin. *The AAPS journal*.

- 2017;19(6):1691-702. doi: [10.1208/s12248-017-0154-9](https://doi.org/10.1208/s12248-017-0154-9).
72. Tripathi MK. Effect of Nutrition on Production, Composition, Fatty acids and Nutraceutical Properties of Milk. *J Adv Dairy Res* 2. 2014;2:115. doi: [10.4172/2329-888x.1000115](https://doi.org/10.4172/2329-888x.1000115).
73. Busatto S, Vilanilam G, Ticer T, Lin WL, Dickson DW, Shapiro S, et al. Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid. *Cells*. 2018;7(12):273. doi: [10.3390/cells7120273](https://doi.org/10.3390/cells7120273).
74. Zhu L, Sun HT, Wang S, Huang SL, Zheng Y, Wang CQ, et al. Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *Journal of hematology & oncology*. 2020;13(1):152. doi: [10.22541/au.169591330.00765451/v1](https://doi.org/10.22541/au.169591330.00765451/v1).
75. Su W, Li H, Chen W, Qin J. Microfluidic strategies for label-free exosomes isolation and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019 Sep 1;118:686-98. doi: [10.1016/j.trac.2019.06.037](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.037).
76. Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, Kotrbova A, Kaiser K, Klemova D, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4(1):25530. doi: [10.3402/jev.v4.25530](https://doi.org/10.3402/jev.v4.25530).