

اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحریک شده با LPS و تحت تیمار با عصاره چای سبز بر تغییر عملکرد نوتروفیل‌ها

اردشیر عباسی^۱، نسیم رحمانی کوکیا^۲، سید میثم ابطحی فروشانی^{۳*}

^۱گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، ^۲گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً ارتباط سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) بر سلول‌های نوتروفیل ثابت شده است. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات چای سبز به عنوان یک نوشیدنی پر مصرف بر روی عملکرد متقابل سلول‌های بنیادی مزانشیمال در وضعیت پیش التهابی بر روی نوتروفیل‌ها بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان رت، این سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از LPS به مدت ۱ ساعت تیمار شد و سپس مایع رویی دور ریخته و جهت حذف LPS سلول‌ها شستشوداده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از چای سبز (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول‌های مزانشیمال به مدت ۲۴ ساعت دیگر بدون تیمار انکوبه گردیدند و در ادامه سلول‌ها را به مدت ۴ ساعت با نوتروفیل‌ها انکوبه شدند. در پایان عملکرد نوتروفیل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز کروسیکال والیس استفاده شد. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش التهابی (تیمار شده با LPS) موجب کاهش قدرت حیاتی، برداشت نوترال رد و قابلیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های مجاور شده، گشت. تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال التهابی با غلظت بالای عصاره چای سبز باعث کاهش بیشتر برداشت رنگ نوترال رد (NR) و شدت انفجار تنفسی به وسیله سلول‌های نوتروفیل مجاور شده، گشت. همچنین زنده ماندن نوتروفیل‌های مجاور شده با مزانشیمال التهابی با چای سبز به صورت غیر وابسته به دوز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط پیش التهابی با چای سبز می‌تواند موجب تقویت عملکرد سلول‌های مزانشیمال در افزایش بقا و کاهش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمال، لیپوپلی ساکارید، نوتروفیل، چای سبز

* نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی

E-mail: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

نوتروفیل‌ها فراوان‌ترین گلبول سفید در گردش خون با قابلیت بیگانه‌خواری و واسطه اولین پاسخ‌های التهابی در ایمنی ذاتی هستند. این سلول‌ها سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کنند که در صورت تولید لجام گسیخته منجر به آسیب به بافت‌های میزبان خواهد شد (۱). نوتروفیل‌ها سلول‌های کاملاً تمایز یافته بوده که پس از تولید در مغز استخوان قابل تقسیم نبوده و طول عمر آن‌ها از چند روز تجاوز نمی‌کند. در طی عفونت، نوتروفیل‌ها به وسیله فرآورده‌های دیواره سلول باکتریایی مثل؛ لیپو پلی ساکارید، LPS و مورامیل دی پپتید، MDP و واسطه‌های التهابی مثل اینترفرون‌گاما (IFN γ) فعال می‌شوند (۲).

از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی مثل؛ استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند. این سلول‌ها همچنین به عنوان سلول‌های حمایت کننده برای سلول‌های هماتوپوئیتیک در مغز استخوان نیز مطرح هستند (۳). با توجه به دسترسی آسان به سلول‌های بنیادی بالغ و قابلیت استفاده بالقوه در طب ترمیمی، این سلول‌ها امیدها را برای درمان بیماری‌های مختلف در آینده افزایش می‌دهند (۴). علاوه بر این نشان داده شده است که این سلول‌ها قابلیت تعدیل کننده ایمنی نسبتاً بالایی

نیز برخوردار هستند (۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط داخلی مغز استخوان و یا در بافت‌های محیطی در ارتباط نزدیک با سلول‌های نوتروفیل قرار می‌گیرند (۱). به نظر می‌رسد که این سلول‌ها در حفاظت سلول‌های نوتروفیل از مرگ زودرس و مهار فعال‌سازی آنها در محیط داخلی مغز استخوان نقش دارند (۶). مطالعه‌های انجام شده نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمال مقیم در بافت در فراخوانی سلول‌های نوتروفیل و افزایش قابلیت‌های التهابی آنها به دنبال چالش میکروبی دارای نقش اساسی هستند (۷).

پس از عفونت و یا در طول آسیب، سلول‌های مزانشیمال با طیف گسترده‌ای از الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) و یا مولکول‌های مرتبط با آسیب، مواجه می‌شوند که منجر به تغییر در تکثیر، مهاجرت و تمایز آنها می‌شود. درک این آسیب‌ها و علایم عفونت عمدتاً بر عهده گیرنده Toll-Like Receptors (TLRs) و الگوهای مولکولی مرتبط با خطر (DAMPs) درونی است می‌باشد. به طور مثال شناخت لیپو پلی ساکارید باکتریایی (LPS) به عنوان الگوی مولکولی مرتبط با دسته باکتری‌های گرم منفی به وسیله Toll-like receptor 4 در این سلول‌ها صورت می‌گیرد (۸).

چای سبز از برگ گیاه *Camellia Sinensis* استخراج می‌شود و یکی از پرمصرف‌ترین و متداول‌ترین آشامیدنی‌ها پس از آب محسوب می‌شود، به علاوه به عنوان یک گیاه دارویی به شمار می‌آید که

شد (۱۳). رت‌های مزبور از حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. تمامی مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت. بدین منظور پس از کشتار رت‌ها به شیوه انسانی، با استفاده از قیچی و اسکالپل، استخوان‌های ران و ساق پا از استخوان لگن رت‌ها جدا شد. با استفاده از تامپون استریل پوست و ماهیچه اضافی از استخوان‌ها جدا و سپس آن‌ها داخل پتری دیش حاوی محیط کشت استریل قرار داده شد. سپس اقدام به فلاشینگ مغز استخوان‌های مزبور به کمک محیط کشت DMEM ساخت (Gibco - انگلستان) شد. سلول‌های حاصله پس از ۲ بار شستشو، با غلظت 4×10^5 سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد FBS ساخت (Gibco - انگلستان) منتقل شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در گرمخانه گرماگذاری شدند، سپس سلول‌های غیرچسبنده حذف و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت زیرا سلول‌های چسبنده مزانشیمال می‌باشند. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یکبار انجام گرفت و پس از اولین تراکم بیش از ۸۰ درصد، سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین (Sigma آمریکا) حاوی ۲ درصد EDTA از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل شدند. در نهایت، از پاساژ سوم سلول‌ها جهت انجام آزمایش‌های مجاورسازی با نوتروفیل‌ها استفاده گردید (۱۳).

خواص بسیار سودمندی همچون آثار ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی دارد (۹). چای سبز دارای اثرهای ضد انعقاد خون، ضد سرطان و ضد HIV و همچنین موجب افزایش ایمنی غیر اختصاصی بدن می‌شود (۹ و ۱۰). به علاوه دارای ترکیب‌هایی از جمله: (EGCG, Caffein, polyphenol, Catechin, Vitamin B.C.E) می‌باشد که اثرات نوروپروتکتیو خود را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، مانع ترشح اینترفرون گاما، مهار TNF α و مهار کاسپاز ۳، کاهش پروکسیداسون چربی، پایین آوردن قند خون، کاهش آپوپتوز و نیز آثار ضدالتهابی اعمال می‌کند (۱۲ و ۱۱).

تاکنون مطالعه‌های قابل توجهی در مورد نقش عوامل محیطی در شرایط التهابی در شکل‌دهی ارتباط بین سلول‌های مزانشیمال و نوتروفیل در دسترس نبوده است. پس بدین منظور عصاره آبی چای سبز به عنوان عامل محیطی پرمصرف، بر عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با LPS (به منظور ایجاد شرایط التهابی) بر نوتروفیل‌ها ارزیابی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی و مطابق معاهده هلسینکی رعایت شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان‌های تیپیا و فمور و ستیغ ایلئاک رت‌های نژاد ویستار مطابق روش زاپیا و همکاران جداسازی

حیوان با حجم مساوی از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد رقیق شد، به طور جداگانه، ۱ میلی‌لیتر از مگومین با ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد ورتکس شد، ۲ میلی‌لیتر خون رقیق شده به آرامی به روی مگومین منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۲۴۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی رسوب سلولی خارج و رسوب حاصل را با ۴۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد همگن شد. به منظور حذف گلوبول قرمز آب مقطر سرد استریل به مدت ۳۰-۴۰ ثانیه به فالكون اضافه و بلافاصله ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۲ درصد داخل فالكون ریخته و مخلوط گردید. فالكون به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۴۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و رسوب با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت همگن گردید در پایان زنده‌مانی و تعداد سلول با استفاده از روش تریپان بلو تعیین گردید. سپس تعداد 2×10^6 سلول نوتروفیل در حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر به همراه 2×10^5 سلول بنیادی مزانشیمال داخل پلیت‌های ۶ خانه ریخته شد. سپس به مدت ۴ ساعت، تحت شرایط ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۸۰ درصد انکوبه گردیدند. بعد از گذشت زمان انکوبه شدن سلول‌های نوتروفیل جمع‌آوری شد و جهت انجام تست‌های تکمیلی زیر استفاده شد.

جهت ارزیابی میزان برداشت رنگ نوترال رد (NR)، در هر پلیت ۹۶ خانه به مقدار ۲۵۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل (2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر) مجاور شده با مزانشیمال، به همراه ۲۰

جهت تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS، پس از پاساژ سوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS به میزان ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴ ساعت تیمار شد (به منظور بازسازی شرایط التهابی) سپس به منظور حذف LPS محیط رویی را دور ریخته و سلول‌ها با PBS شستشو داده شد (۱۴).

پس از تهیه برگ چای سبز، جنس و گونه آن به وسیله کارشناس هرباریوم دانشگاه ارومیه تأیید شد. سپس برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر شد. آنگاه عصاره آبی برگ چای سبز به روش زهیر و همکاران تهیه شد (۱۵).

پس از اتمام تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS، این سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از عصاره چای سبز (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی سلول‌ها جمع‌آوری شده و به دور ریخته شد. پس از شست و شوی سلول‌ها به منظور حذف بقایای عصاره چای سبز، به سلول‌ها محیط کشت تازه افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت سلول‌های بنیادی مزانشیمال برای انجام آزمایش استفاده شد.

سلول‌های نوتروفیل از خون محیطی رت‌ها به کمک مگومین کامپاند ساخت شرکت (داروپخش تهران) جداسازی شد (۲۰). به طور خلاصه پس از بیهوشی حیوان، ۵ میلی‌لیتر خون هپارینه (۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) رت استحصالی از قلب

درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا خوان خوانده شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز کروسیکال والیس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

سلول‌های جدا شده از مغز استخوان پس از کشت دادن در محیط کشت پس از چند روز به تدریج کشیده شده و مشابه سلول‌های فیبروبلاست می‌گردند. در نهایت از پاساژ سوم سلول‌های کشت داده شده به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمال استفاده شد (شکل ۱).

مطابق نمودار زنده ماننی نوتروفیل‌ها، سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با LPS باعث کاهش بقای نوتروفیل‌ها شد. در همین راستا سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با عصاره چای سبز در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را در افزایش برگشت عملکرد بقای نوتروفیل‌ها به صورت غیر وابسته به دوز را دارد (نمودار ۱).

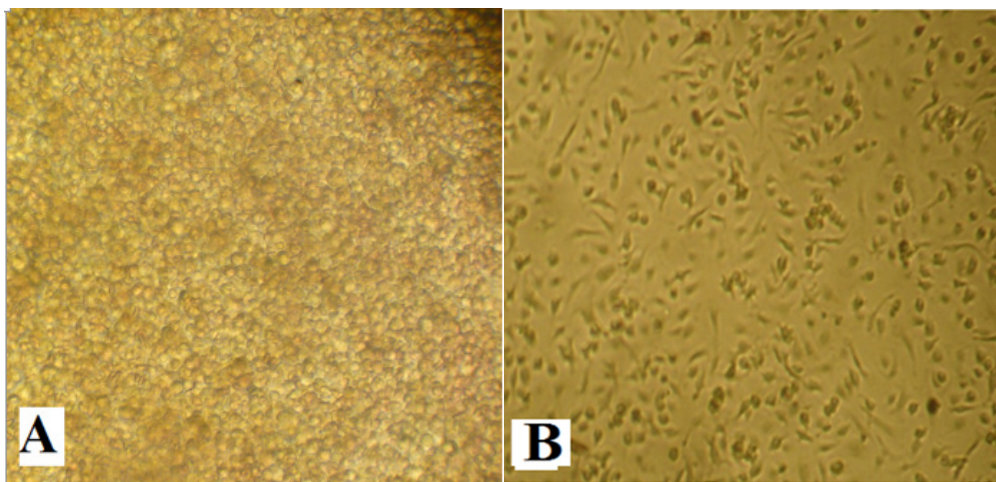
قابلیت برداشت NR یک ارزیابی کلی از عملکرد بخش لیزوزومی نوتروفیل‌ها ارایه می‌دهد، سلول‌های مزانشیمال تحریک شده با LPS باعث کاهش میزان برداشت NR نسبت به نوتروفیل خالی شد. البته سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با عصاره چای سبز

میکرولیتر از محلول NR (۳/۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال - اتانول (اسیداستیک ۱ درصد و اتانول ۵۰ درصد) به چاهک‌ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا خوان خوانده شدند.

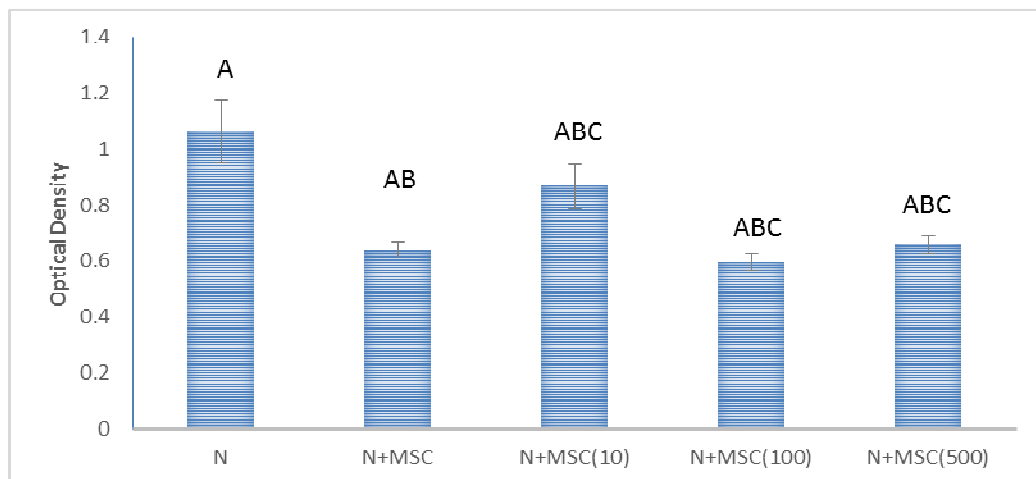
برای ارزیابی انفجار تنفسی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر کاندیدا اپسونیزه (۱×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال (۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر) به همراه ۳۰ میکرولیتر از محلول NBT (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها سه بار شسته شده و با متانول تثبیت شدند. آنگاه کریستال‌های فیکس شده فورمازون با افزودن ۱۴۰ میکرولیتر DMSO و ۱۲۰ میکرولیتر KOH دو مولار حل شد. پلیت‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا خوان خوانده شدند. همچنین برای سنجش میزان زنده ماننی سلول‌های نوتروفیل، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل (۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر) مجاور شده با مزانشیمال، به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر در ۳۷

طبق نتایج تست NBT سلول‌های مزانشیمال مجاور شده با LPS باعث کاهش انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها شدند. همچنین تیمار سلول‌های مزانشیمال با عصاره چای سبز به صورت وابسته دوز باعث تشدید کاهش انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در مقایسه با نوتروفیل مجاور شده با مزانشیمال بدون تیمار و حتی نوتروفیل خود، به تنهایی شد (نمودار ۳).

در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌داری در برداشت NR به وسیله سلول‌های نوتروفیل نسبت به گروه کنترل شده است (نمودار ۲).
آزمون احیای NBT ارزیابی کلی از قابلیت انفجار تنفسی در مخمر افسونیزه به وسیله نوتروفیل‌ها را ارایه می‌دهد.

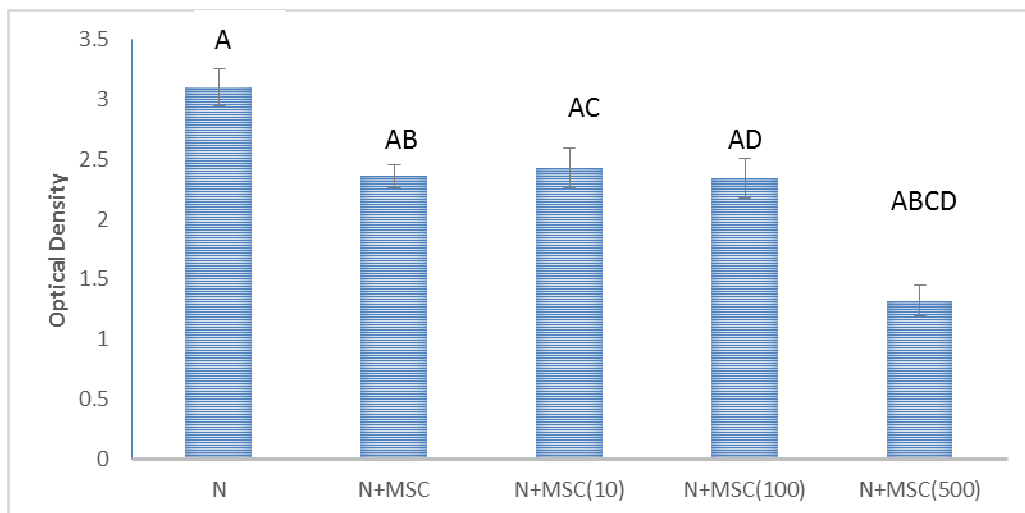


شکل ۱: پاساژ سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان. تصویر (A) سلول‌های آسپیره شده مغز استخوان در روز ۱. تصویر (B) تغییر شکل این سلول‌ها و دوکی شدن کامل آنها پس از پاساژ سوم کاملاً مشهود می‌باشد (بزرگنمایی $\times 40$).



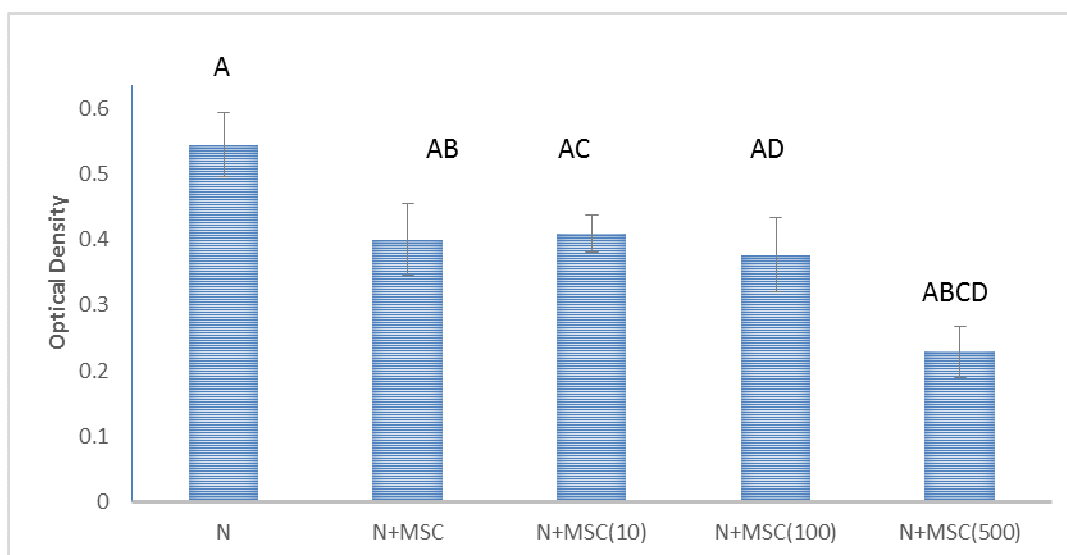
نمودار ۱: ارزیابی میزان زنده مانی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش‌تهایی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت چای سبز. حروف یکسان نشان دهنده بر روی نمودارها اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

N: نوتروفیل‌های تنها، N+MSCs: نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکروگرم بر میلی لیتر است.



نمودار ۲: ارزیابی میزان برداشت رنگ نوترال رد به وسیله نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش‌انتهایی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت چای سبز. حروف یکسان نشان دهنده بر روی نمودارها اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

N: نوتروفیل‌های تنها، N+MSCs: نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکروگرم بر میلی لیتر است.



نمودار ۳: ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت‌های متفاوت چای سبز می‌باشد. حروف یکسان نشان دهنده بر روی نمودارها اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

N: نوتروفیل‌های تنها، N+MSCs: نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

نحوه جالب توجهی سلول‌های بنیادی موجود در مغز استخوان و بافت‌های محیطی دارای فنوتیپ مشابهی می‌باشند (۲۰ و ۲۱).

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمال در بافت‌های محیطی در ارتباط نزدیک با سلول‌های نوتروفیل قرار می‌گیرند (۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمال در هنگام مواجهه با LPS، گیرنده‌های شبه‌تول (TLRs) روی سلول‌های مزانشیمال بارز شده و آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. TLRها جزو گیرنده‌های ایمنی ذاتی، شناسایی کننده طیف وسیعی از PAMPهای باکتریایی، ویروسی، قارچی و برخی از مولکول‌های میزبان می‌باشند (۲۲). TLRها بر روی پیش‌ساز بافت‌های گوناگونی همچون HSC، EPS، MSC، پیش‌ساز رتینال و پیش‌ساز سلول عصبی (NPS) بیان می‌شوند (۲۳). از آنجایی که سیگنال‌های خطر باعث فراخواندن سلول‌های ایمنی به محل آسیب می‌شوند می‌توان انتظار هم‌چنین عملکردی را در سلول‌های مزانشیمال نیز داشت. تحقیق‌ها نشان داده است که لیگاند TLRهای ۱-۸ بر روی MSC بیان می‌شود، اما TLR9 بیان نمی‌شود. مشخص شده است هنگامی که MSC با LPS به چالش کشیده می‌شود موجب افزایش بیان و عرضه بیشتر TLR2 و TLR4 روی MSC می‌شود، در این راستا فعال شدن TLR₄ باعث افزایش بیان NFκB، MAPK، PI3K، افزایش بیان چندین سایتوکاین از جمله IL8، IL1β، IL6، CXCL10، ترشح IRF3، تولید RANTES، INFβ (۲۴ و ۲۵)، هم‌چنین ظاهر شدن بیشتر گیرنده‌های

تحقیق‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بازسازی بافت، گریز از سیستم ایمنی، خاصیت تنظیم کننده یا مهار کننده بروی پاسخ‌های سیستم ایمنی را دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال تکثیر و عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cell) و تشکیل سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک از مونوسیت‌ها را مهار می‌کنند این سلول‌ها در شدت ایجاد پاسخ‌های التهابی و پاسخ های ایمنی نوع ۱ و تمایز سلول‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی تأثیر زیادی دارند (۵ و ۱۶). مهم‌ترین فاکتورهای سرکوب کننده ایمنی این سلول‌ها شامل برخی از مولکول‌های مهارتی بیان شده در سطح آنها از قبیل: PDL1، TGF-β، HLA-G، Galectins، برخی سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند (TGF-β، IL-10)، برخی متابولیت‌ها از قبیل: نیتریک اکساید، IDO و پروستاگلاندین‌ها)، فاکتور تعدیل کننده التهاب (هم اکسیژناز ۱) و برخی از آنزیم‌های مهارکننده مانند (ماتریکس متالوپروتئینازها) می‌باشند که به صورت پاراکرین و یا در تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را بروز می‌دهند (۱۸ و ۱۷). به نظر می‌رسد که عملکردهای سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت کنترل سیستم‌های متعدد انتقال دهنده پیام می‌باشند (۱۹). به

سیستم ایمنی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، مهار ترشح اینترفرون گاما، مهار TNF α ، مهار کاسپاز ۳، هم‌چنین کاهش بیان مسیر TLR4/NFK β P65، کاهش آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی (IL6, IL1 β , TNF α)، کاهش ظرفیت مهاجرت نوتروفیل، کاهش فعالیت تولیدی MPO و HOCL، کاهش کموکاین‌های CXCL، GRO α (تحریک کموتاکسی نوتروفیل)، MCP-1 (تحریک کموتاکسی منوسیت)، G-CSF (فاکتور تولید کننده گرانولوسیت) اعمال می‌کند (۳۲). در حالی که باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، افزایش ظرفیت فاگوسیتی، افزایش القای ترشح β دیفنسین نیز می‌شود (۳۳). شایان ذکر است که چای سبز حاوی ترکیب‌هایی مثل: polyphenol, Caffeine, EGCG، می‌باشد (۱۱) به طور جالب توجهی مشخص شده است که مصرف عادی کافئین در فرآورده‌هایی از قبیل قهوه و چای سبز منجر به اثرات تعدیل‌کننده ایمنی و ضدالتهابی در افراد مصرف‌کننده این ترکیب‌ها می‌گردد (۳۴).

در بسیاری از مطالعه‌ها گزارش کردند که چای سبز باعث کاهش مسیرهای کاسپاز ۳، NFK β ، ERK، ERAP می‌شود که باعث به تأخیر انداختن آپوپتوز در نوتروفیل‌ها خواهد شد (۳۶ و ۳۵). در مطالعه حاضر سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با چای سبز در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث افزایش زنده ماندن نوتروفیل‌ها گردید، بنابر این یافته‌ها ممکن است سازوکار جدیدی در این زمینه از

HLAI، HLAII و مولکول‌های کمک‌حرکی (CD86, CD80, CD40) می‌شود (۲۶). جالب توجه است که از بین TLRها، TLR $_2$ و TLR $_4$ بیشترین اثر ایمنومدولاتوری را بر روی MSC اعمال می‌کند (۲۷). به همین دلیل در مطالعه حاضر از LPS به عنوان لیگاند TLR4 جهت ارزیابی اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر نوتروفیل‌ها در یک عفونت شبیه‌سازی شده استفاده شد. در مطالعه‌ای مشخص شده است که اثرات ایمنومدولاتوری مزانشیمال نه تنها بر روی خود مزانشیمال اثرگذار است، بلکه بر روی سلول‌های ایمنی که در ارتباط و تماس با مزانشیمال می‌باشد نیز مؤثر است (۲۸). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که تحریک TLRs خاص بر پاسخ‌های ایمنو مدولاتوری سلول‌های استرومایی مزانشیمی تأثیر می‌گذارد. سلول‌های مزانشیمال به دنبال تحریک TLR 4 با LPS به سمت فنوتیپ MSC1 و به دنبال تحریک TLR3 با Poly-IC به سمت فنوتیپ MSC2 پلاریزه می‌شوند. MSC1 سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و MSC2 سایتوکاین‌های ایمنو ساپرسیو را ترشح می‌کنند (۳۰ و ۲۹). تحریک MSC به وسیله TLR4 باعث ایجاد شرایط پیش‌التهابی می‌شود که احتمالاً اثرات ایمنومدولاتوری خود را بر روی سلول‌های ایمنی از طریق TGF β اعمال می‌کند، در نتیجه از طریق سیگنالینگ TGF β و SMAD3 باعث سرکوب التهاب می‌شود (۳۱).

در تحقیق‌های گذشته نشان داده شده است که چای سبز در شرایط التهابی اثرات خود را بر روی

طریق اثرگذاری بر عملکرد MSCs بر نوتروفیل‌ها داشته باشد.

تحریک سلول‌های مزانشیمال بافتی با اندوتوکسین باکتریایی از طریق گیرنده‌های شبه تول (Toll-like Receptor) موجب افزایش آزادسازی مقدار زیادی از سایتوکاین‌های التهابی از قبیل IL-8، MIF و در پی آن موجب فراخوانی، افزایش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها می‌شود و تحقیق‌ها نشان داده است که IL-6 تولید شده از MSCs موجب افزایش بقا و مهار آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل می‌گردد (۱) احتمالاً تیمار چای سبز بر آزاد سازی IL-6 از سلول‌های MSC اثر داشته است. رنگ نوترال رد (NR) یک رنگ کاتیونی بوده که نوتروفیل‌ها بر اساس میزان فعالیت خود قادر به برداشت و ذخیره سازی آن در اندامک‌های خود (لیزوزم‌هایشان) می‌شود. برداشت یا میزان فاگوسیتوز NR (فاگوسیتوز پایه) به وسیله سلول‌های نوتروفیل بسته به فاکتورهایی از قبیل میزان زنده‌مانی و خصوصیات غشای آنها دارد (۲۷). در این مطالعه تیمار سلول‌های مزانشیمال با چای سبز باعث کاهش برداشت NR به وسیله نوتروفیل‌های مجاور شده با مزانشیمال گردید.

در مجموع به نظر می‌رسد که افزایش بیان TLRها و یا تحریک آنها بر روی MSC باعث تشدید اثر ایمونومدولاتوری MSC می‌شود که در کاهش شدت بیماری‌های التهابی مزمن و بیماری‌های اتوایمیون هم‌چون کرون، روماتوئید آرتریت مفید خواهد بود (۳۸ و ۳۲). گزارش‌ها دال بر افزایش اثرات

ایمونوساپروسری MSC بر روی سلول‌های ایمنی به وسیله فعال شدن TLR4 شامل؛ مهار فاکتور رونویسی Noth و کاهش تکثیر لنفوسیت T(۲۳) ممانعت از تمایز و بلوغ دندرتیک سل به وسیله IL6 تولید شده از MSC (۳۹) ممانعت از فعالیت کشندگی NK می‌باشد (۴۰)، نشان داده شده است که نتیجه تحریک سلول‌های مزانشیمال، باعث جذب و کموتاکسی سلول ایمنی ذاتی نوتروفیل می‌شود. به علاوه مشاهدات نشان داد است که فعال شدن MSC با LPS باعث از سرباز گیری دوباره سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی شود.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز از جمله مهم‌ترین عوامل درگیر در حذف عوامل محیطی مهاجم به وسیله نوتروفیل‌ها می‌باشد (۴۱). با وجود این زمانی که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیش از حد بوده و یا در شرایط نامناسبی تولید کردند، این رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ایجاد آسیب بافتی و شرایط ایمونوپاتولوژیک دخالت می‌نماید (۴۲). نقش فعالیت نامناسب نوتروفیل‌ها در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های خود ایمن و خود التهابی نشان داده شده است (۶). یک مطالعه جدید نیز حاکی از آن بوده است که مصرف کافئین به خودی خود می‌تواند منجر به کاهش قابلیت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله نوتروفیل‌ها گردد (۴۱). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از آن بود که تیمار سلول‌های مزانشیمال باعث کاهش انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها گردید. با توجه به خاصیت بالقوه مضر رادیکال‌های اکسیژن در آسیب بافتی کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث کاهش

آسیب‌های بافتی و پاتولوژیکی نوتروفیل‌ها در شرایط خود التهابی می‌شود. این مسئله احتمالاً به دلیل کاهش سایتوکاین‌های التهابی IL-8 و IL-6 به وسیله سلول‌های مزانشیمال می‌باشد. همان‌طور که ذکر شد در گذشته نیز به اثرات مستقیم ضد التهابی چای سبز اشاره شده است. بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد که لا اقل بخشی از اثرات مفید ضد التهابی چای سبز به دلیل تغییر در عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر سلول‌های نوتروفیل باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، به نظر می‌رسد تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط پیش التهابی با چای سبز می‌تواند موجب تقویت عملکرد سلول‌های مزانشیمال در افزایش بقا و کاهش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر حاصل یک طرح پژوهشی در دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه انجام گردید

REFERENCE

1. Farmakis D, Giakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. *Medical science monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2003; 9(1): RA19-22.
2. Turina M, Miller FN, McHugh PP, Cheadle WG, Polk HC. Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. *Inflammation* 2005; 29(1): 55-63.
3. Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity* 2008; 31(3): 288-94.
4. Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62(12): 1156-66.
5. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology* 2012; 12(5): 383-96.
6. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells* 2008; 26(1): 151-62.
7. Brandau S, Jakob M, Hemedda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal of leukocyte Biology* 2010; 88(5):1005-15.
8. Koh SH, Lee SM, Kim HY, Lee KY, Lee YJ, Kim HT, et al. The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neuroscience letters* 2006; 395(2): 103-7.
9. Kakuda T. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25(12): 1513-8.
10. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* 2007; 81(7): 519-33.
11. Ivanov V, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007; 49(3): 140-5.
12. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; 17(5): 291-3.
13. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106(5): 1755-61.
14. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *Journal of Immunology* 2009; 182(12): 7963-73.
15. Raihan SZ, Chowdhury AK, Rabbani GH, Marni F, Ali MS, Nahar L, et al. Effect of aqueous extracts of black and green teas in arsenic-induced toxicity in rabbits. *Phytotherapy Research PTR* 2009; 23(11): 1603-8.
16. Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunology Today* 1988; 9(7-8): 222-9.

17. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology* 2008; 8(9): 726-36.
18. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009; 20(5-6): 419-27.
19. Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2015; 18(7): 672-6.
20. Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2009; 18(1): 103-12.
21. Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *British Journal of Pharmacology* 2010; 161(7): 1542-52.
22. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430(6996): 257-63.
23. Opitz CA, Litzenger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Koppel A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells* 2009; 27(4): 909-19.
24. Raicevic G, Najar M, Pieters K, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. *Tissue Engineering Part A* 2012; 18(13-14): 1410-8.
25. Chen X, Zhang ZY, Zhou H, Zhou GW. Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists. *Development Growth & Differentiation* 2014; 56(3): 233-44.
26. Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biology* 2008; 9: 52.
27. Lei J, Wang Z, Hui D, Yu W, Zhou D, Xia W, et al. Ligation of TLR2 and TLR4 on murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. *Cellular Immunology* 2011; 271(1): 147-56.
28. Gur-Wahnon D, Borovsky Z, Beyth S, Liebergall M, Rachmilewitz J. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Experimental Hematology* 2007; 35(3): 426-33.
29. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS One* 2010; 5(4): e10088.
30. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PloS One* 2012; 7(9): e45590.
31. Nemeth K, Mayer B, Mezey E. Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. *Journal of Molecular Medicine* 2010; 88(1): 5-10.

32. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13(42): 5577- 80.
33. Ishihara S, Rumi MA, Ortega-Cava CF, Kazumori H, Kadowaki Y, Ishimura N, et al. Therapeutic targeting of toll-like receptors in gastrointestinal inflammation. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12(32): 4215-28.
34. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2025-32.
35. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, Oudrhiri N, Chouaib S, Azzarone B, et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells* 2014; 32(1): 290-300.
36. Lombardo Bedran TB, Feghali K, Zhao L, Palomari Spolidorio DM, Grenier D. Green tea extract and its major constituent, epigallocatechin-3-gallate, induce epithelial beta-defensin secretion and prevent beta-defensin degradation by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 2014; 49(5): 615-23.
37. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe?. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111(3): 877-92.
38. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* 2001; 21: 381-406.
39. Gardai SJ, Whitlock BB, Xiao YQ, Bratton DB, Henson PM. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(43): 44695-703.
40. Antal P, Sipka S, Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Annals of Hematology* 1995; 70(5): 259-65.
41. Hamaliaka A, Novikova I. Nitric oxide production disorders in leukocytes of patients with recurrent furunculosis. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2010; 154(2): 163-7.
42. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000; 109(1): 33-44.

The Change in the Functions of Neutrophils after Being Stimulated with LPS-primed Mesenchymal Stem and Treated with Green Tea

Abbasi A¹, Rahmani Kukia N², Abtahi Froushani SM^{1*}

¹Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, ²Department of Biochemistry, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 27 Jun 2016

Accepted: 19 Aug 2016

Abstract

Background & aim: Recently, the interaction of lipopolysaccharide activated by mesenchymal stem cells and neutrophils has been proven. The aim of the present study was to evaluate the effect(s) of the Green tea extract, as a widely consumed beverage on the interaction of lipopolysaccharide activated MSCs on neutrophils.

Methods: In the present experimental study, after the isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow of rats was conducted, these cells were stimulated with 10 ng/mL LPS for 1. Then, the supernatant was discarded and washed out to remove LPS cells. Afterwards, the cells were incubated with different concentrations of green tea (10, 100 and 500 micrograms per ml) for 24 hours. Subsequently, the mesenchymal stem cells were co-cultured with neutrophils and incubated for other 4 h. Finally, the neutrophil function was evaluated. The data were analyzed by Kruskal wallis test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: Pro-inflammatory mesenchymal stem cells (Challenged with LPS) caused a decrease in vitality, Neutral Red-uptake and respiratory burst of activated neutrophils. Treatment of pro-inflammatory mesenchymal stem cells with higher concentration of green tea extract potentiated the decrease rate of Neutral Red-uptake and respiratory burst of activated neutrophils. Moreover, the vitality of neutrophils increased in a dose-independent manner by green tea extract.

Conclusion: It seemed that the treatment of mesenchymal stem cells in inflammatory condition with Green tea extract may potentiate the role of mesenchymal stem cells to increase phagocytosis and the respiratory burst of neutrophils cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Lipopolysaccharide, Neutrophil, Green tea extract

Corresponding author: Abtahi Froushani SM, Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows:

Abbasi A, Rahmani Kukia N, Abtahi Froushani SM. The Change in the Functions of Neutrophils after Being Stimulated with LPS-primed Mesenchymal Stem and Treated with Green Tea. *Armaghane-danesh* 2016; 21 (6): 521-535.