مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۱، فروردین ۱۳۹۳(شماره پی در پی۸٤)

اثر سلول بنیادی مزانشیمی رت و فاکتورهای محلول ناشی از آن بر عملکرد نوتروفیل خون محیطی

سحرهامون نورد*، نوروز دلیرژ

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های مزانشیمی‌جمعیتی از سلول‌های بنیادی بالغان می‌باشند که منبع مناسبی برای اهداف درمانی به شمار می‌روند. هدف این مطالعه بررسی اثر سلول مزانشیمال رت و فاکتورهای محلول ناشی از آن بر عملکرد نوتروفیل خون محیطی بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی بر روی سلول مزانشیمی رت انجام شد. سلول مزانشیمال از مغز استخوان فمور و تیبای رت ۸ ـ ٦ هفته استحصال، و در محیط کشت DMEM کشت داده شد. پس از بلوغ، سلول مزانشیمال و مایع رویی آن در نسبت‌های ۱:۲، ۱:٤ و ۳:٤ با نوتروفیل خون محیطی مجاور شده و سپس عملکرد فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیل با فاگوسیتوز مخمر و آزمایش احیای نیتروبلوتترازولیوم مورد سنجش قرار گرفت. داده‌ها با آزمون‌های آماری تی، آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند($p>۰/۰۵$).

یافته‌ها: میزان فاگوسیتوز در نوتروفیل مجاور شده با سلول مزانشیم نسبت به گروه کنترل کاهش داشت، اما این کاهش معنی‌دار نبود($p>۰/۰۵$). میزان فاگوسیتوز در گروه تیمار با مایع رویی سلول نسبت به گروه کنترل در هر سه نسبت ۱:٤، ۱:۲، ۳:٤ افزایش داشت که این افزایش در مورد هر سه نسبت معنی‌دار بود($p< ۰/۰۵$). میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل تیمار شده با سلول مزانشیم، به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. انفجار تنفسی در گروه‌های تیمار با مایع رویی سلول افزایش داشت که این تأثیر فقط در مورد نسبت ۱:۲ معنی‌دار بود و در دو نسبت دیگر این اختلاف معنی‌دار نبود($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: برهمکنش سلول مزانشیمال با سلول نوتروفیل می‌تواند از نظر استراتژی‌های درمانی در بیماری‌های مرتبط با عملکرد نوتروفیل و پاسخ فیزیولوژیک و حتی پاتولوژیک در سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابل توجه باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول مزانشیم، فاکتورهای محلول، فاگوسیتوز، نوتروفیل

***نویسنده مسؤل**: **دکتر نوروز دلیرژ**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب‌شناسی

Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

مقدمه

مغز استخوان دارای دو نوع سلول بنیادی مزانشیم و هماتوپوئیتیک می‌باشد(۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌معمولاً از نمونه‌های مغز استخوان کرست ایلیاک لگن، تیبیا و فمور جداسازی می‌شوند(۲). علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌شامل؛ بافت پریوست، استخوان ترابکولار، بافت چربی، پرده سینویال، عضله اسکلتی و دندان شیری است. سلول‌های بنیادی خاصیت انعطاف‌پذیری[۱] دارند، که این مکانیسم‌ها شامل؛ پرتوانی و تمایز به اغلب سلول‌های بدن، تحت شرایط خاصی به عقب بازگشته و به انواعی از سلول‌ها تبدیل می‌شوند؛ و تمایز به سلول‌های بافت‌های غیر مزانشیمی در اثر ادغام سلولی و تغییر الگوی بیان ژنی می‌باشند(۳). این سلول‌ها قادر به ایجاد کلنی در زمان کشت، چسبیدن به سطح کشت بوده که قابلیت تمایز به سه رده استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت را دارند(٤).

نقش سلول‌های مزانشیم در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی در زمینه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، که می‌توان به مهار تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌های T انسان و مدل موشی با تداخل در چرخه سلولی از طریق ممانعت از تقسیم سلولی در مرحله G۰-G۱، مهار بیان سیکلین D۲ و سلول‌های دندریتیک اشاره کرد(٦و٥)، اما نقش آن هنوز در ایمنی ذاتی به خوبی مشخص نشده است. مطالعه‌ای نشان می‌دهد که سلول مزانشیمال انسانی می‌توانند بر بقا و عملکرد نوتروفیل‌ها موثر بوده و حتی از آپوپتوز آنها ممانعت کند(۷). سیستم ایمنی ذاتی به عنوان اولین خط دفاعی علیه عوامل عفونی است. نوتروفیل‌ها به عنوان یکی از اجزای این سیستم، اولین مدیاتور جهت مقابله با عوامل باکتریایی و قارچی قبل از سیستم ایمنی هومورال و سلولی هستند. اهمیت نوتروفیل در نوتروپنی حاصل از شیمی درمانی یا واکنش به داروهای سایتوتوکسیک و به دنبال نقایص شدید ایمنی نیز مشهود است(۸).

باتوجه به این که دانش سلول‌های بنیادی روبه افزایش است، واکنش سلول‌های بنیادی با سلول‌های ایمنی قابل توجه بوده، که در زمینه ایمنی اکتسابی و تاحدی ایمنی ذاتی مطالعاتی صورت گرفته است. در این بررسی باتوجه به اهمیت نوتروفیل به عنوان اولین خط دفاعی بدن در سیستم ذاتی و نقش آن در التهاب و کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان، برهمکنش مایع رویی کشت سلول‌های مغز استخوان رت و نوتروفیل بررسی شد، تا با تعمیم نتایج حاصل بتوان در درمان بیماری با تکنیک سلول‌های بنیادی و ایجاد هرچه بیشتر زمینه مطالعاتی در خصوص ایمنی ذاتی و سلول بنیادی بهره گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول بخش ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه

۱-Plasticity

ارومیه و به طور جداگانه و با سه بار تکرار انجام شده است. تمام مراحل کشت و تشخیص سلول بنیادی مزانشیم بر اساس مطالعات از قبل انجام شده و پروتکل صورت گرفت(۹). به‌طور خلاصه، سلول مزانشیم از مغز استخوان فمور و تیبیای موش صحرایی ۸ ـ٦ هفته، با عمل فلاشینگ سرنگ حاوی محیط کشتDMEM[1] سیگما استحصال شده، پس از سانتریفوژ ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و پس از شمارش سلولی به همراه سرم جنین گاوی ۱۵ درصد با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. اولین تعویض کشت پس از ۷۲ ساعت و سپس هر ۳روز یکبار انجام شد.

برای جداسازی نوتروفیل‌ها به طور خلاصه، نمونه خون محیطی هپارینه مستقماً از قلب موش صحرایی گرفته شد. خون را به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹درصد رقیق کرده و سپس به آرامی‌بر مگلومین (شرکت دارو پخش) ۲۵ درصد لود شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پلیت سلولی ته فالکون دو مرتبه به وسیله آب مقطر لیز شده و پس از اضافه نمودن سرم فیزیولوژی ۲/۵۵ درصد به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شده و در نهایت با شست و شوی پلیت سلولی با سرم دکستروز ۵ درصد(سیگما ـ آمریکا) به میزان ۴×۱۰^{٦} بر میلی لیتر همگن گردید(۱۰).

به منظور مجاورسازی نوتروفیل با سلول و مایع رویی سلول مزانشیم، پس از بلوغ سلول مزانشیم در روز ١٤، تعداد ۱×۱۰^{٦} بر میلی‌لیتر از سلول مزانشیم را با سوسپانسیون سلولی نوتروفیل حاوی ۴×۱۰^{٦} بر میلی‌لیتر مجاور شدند. مایع رویی سلولی ٤٨ ساعته نیز در سه گروه با نسبت های مختلف ١:٤، ١:٢ و ٣:٤ با سوسپانسیون سلولی نوتروفیل حاوی ۴×۱۰^{٦} بر میلی‌لیتر ترکیب شدند. از طرفی سوسپانسیون نوتروفیل با همین نسبت‌ها با محیط کشت به عنوان کنترل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش بیگانه خواری مخمر، مخمر اپسونیزه شده با سرم رت مورد آزمایش به عنوان آنتی‌ژن در مجاورت نوتروفیل قرار می‌گیرد و با توجه به درصدی که نوتروفیل‌ها مخمر را فاگوسیت کرده‌اند با روش اسلایدی سنجیده می‌شود. برای آماده‌سازی مخمر، کشت ٢٤ ساعته مخمر کاندیدا آلبیکنس را در بافر PBS دو مرتبه با ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده و سپس به میزان ۱×۱۰^{٦} بر میلی لیتر را جهت اپسونیزاسیون در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰درصد سرم تازه رت به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند.

برای انجام آزمایش بیگانه خواری ابتدا دو عدد لام داخل پتری دیش قرار داده و استریل شدند. سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با سلول و مایع رویی سلول در نسبتهای مختلف روی لام ها ریخته و به‌مدت ۲ ساعت در شرایط۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگه داشته شد. سپس سوسپانسون مخمر اپسونیزه را روی لام اضافه کرده و به مدت ۱ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. لام‌ها با PBS حاوی ۱۰ درصد فرمالین فیکس و

۱- Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)

با روش هماتوکسلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. به وسیله میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ٤٠ برابر حداقل ٥ میدان میکروسکوپی به ازای هر لام بررسی گردید تا تعداد کل نوتروفیل‌ها و نوتروفیل‌های حاوی مخمر مشخص شود(١١).

آزمایش احیاء نیتروبلوتترازولیوم(NBT)[1] به منظور سنجش میزان تولید واکنشگرهای فعال اکسیژن در سلول نوتروفیل فاگوسیت کننده استفاده می‌شود. جهت انجام این آزمایش، ١٥ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با سلول و مایع رویی سلول مزانشیم (به طور مجزا) که سلول‌های مخمر اپسونیزه شده را فاگوسیت نمودند (با تراکم ٤×١٠^{٦} بر میلی‌لیتر) همراه با محیط کشت حاوی نیتروبلوتترازولیوم (سیگما) و زیموزان(سیگما) که درست قبل از آزمایش تهیه شد، ترکیب شدند. محلول فوق به مدت ١ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس ٤٠٠ میکرولیتر ماده ان ـ ان- دی متیل فورماید (سیگما) اضافه شد. میکروتیوپ‌ها به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ٣٠٠٠g سانتریفیوژ شدند. دانسیته نوری (OD) ٢٠٠ میکرولیتر از محلول رویی در طول موج ٤٩٢ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد(١١).

لازم به ذکر است که، آزمایش های فوق در نمونه‌های کنترل نیز مانند تیمار انجام شدند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تی، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

درصد بیگانه خواری در گروه نوتروفیل تیمار شده با سلول مزانشیم با میانگین ٥±٤٥ نسبت به گروه کنترل ٢/٨±٥١/٦ کاهش داشت، اما این کاهش معنی‌دار نبود($p<٠/٠٥$)(نمودار١). هم‌چنین میزان بیگانه خواری در سه گروه تیمار با مایع رویی سلول در هر سه نسبت ١:٢، ١:٤ و ٣:٤ نسبت به گروه کنترل افزایش داشت، که این افزایش در مورد هر سه نسبت معنی‌دار بود($p<٠/٠٥$)(نمودار٢). با افزایش دوز، میزان بیگانه‌خواری در بین گروه‌ها افزایش پیدا کرد، که در بین گروه‌ها نسبت ١:٤ با ٣:٤ اختلاف معنی‌دار داشت($p<٠/٠٥$)(جدول ١).

سنجش میزان انفجار تنفسی با آزمایشNBT در نوتروفیل تیمار شده با سلول مزانشیم ٠/٠٢±٠/٤، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ٠/٠٢±٠/٥ کاهش یافت ($p<٠/٠٥$)(نمودار٣).

هم‌چنین میزان انفجار تنفسی در هر سه گروه تیمار با مایع رویی سلول نسبت به کنترل افزایش داشت، که این تأثیر فقط در مورد نسبت ١:٢ معنی‌دار بود و در دو نسبت دیگر این اختلاف معنی‌دار نبود. در بین گروه‌ها فقط نسبت ١:٢ با نسبت ٣:٤ اختلاف معنی‌دار داشت($p<٠/٠٥$)(نمودار٤).

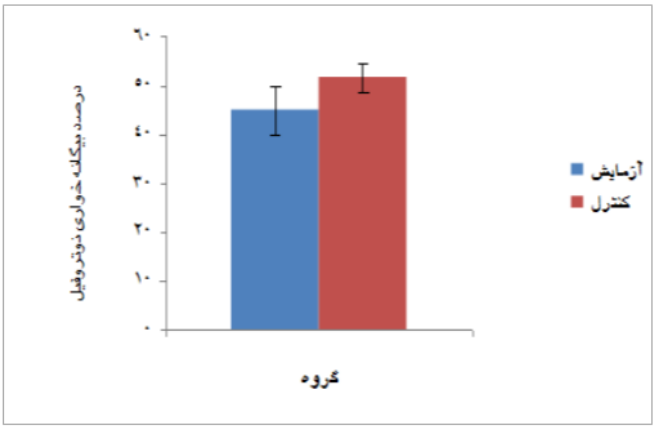
١-Nitro Blue Tetrazolium Reduction(NBT)

جدول۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان بیگانه خواری در نسبت‌های مختلف نوتروفیل مواجه شده با مایع رویی سلول مزانشیم در دو گروه کنترل و آزمایش

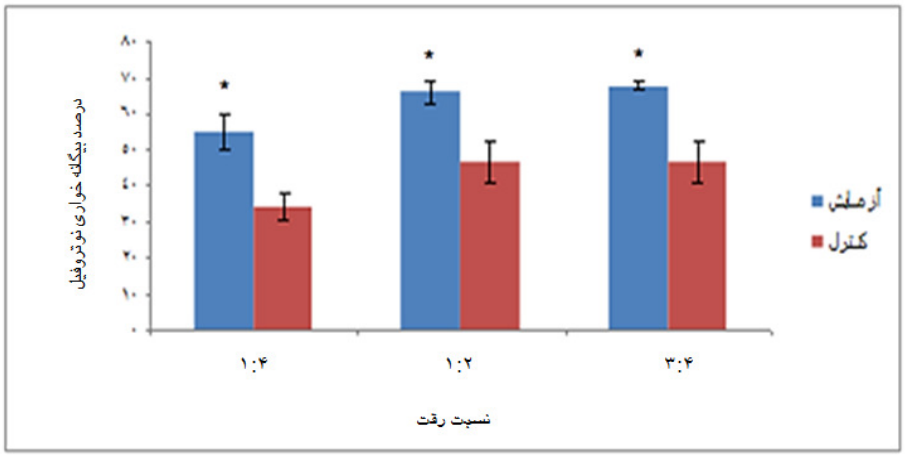
نسبت رفت	گروه کنترل	آزمایش	سطح معنی‌داری
(۱:٤)	۳۳/۸±۳/۷	٥٥±٥	P<۰/۰٥
(۱:۲)	٤٦/٦±٥/۷	٦٥/۸±۲/۹	P<۰/۰٥
(۳:٤)	٤٦/٦±٥/۷	٦۷/٦±۱/۱	p<۰/۰٥

جدول۲: میانگین و انحراف‌معیار مقایسه میزان تولید گونه های فعال اکسیژن در نوتروفیل تیمارشده با مایع رویی سلول در گروه های کنترل و آزمایش

نسبت رفت	گروه کنترل	آزمایش	سطح معنی‌داری
(۱:٤)	۰/٥±۰/۰۱	۰/٦±۰/۰۹	p<۰/۰٥
(۱:۲)	۰/٥±۰/۰۳	۰/۷±۰/۰٤*	p<۰/۰٥
(۳:٤)	۰/٥±۰/۰۳	۰/٥±۰/۰۹	p<۰/۰٥

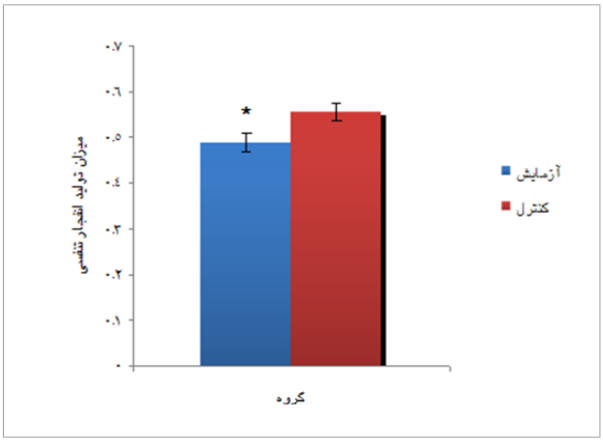


نمودار۱: مقایسه درصد بیگانه خواری نوتروفیل های تیمار شده با سلول مزانشیم در گروه‌های مورد مطالعه



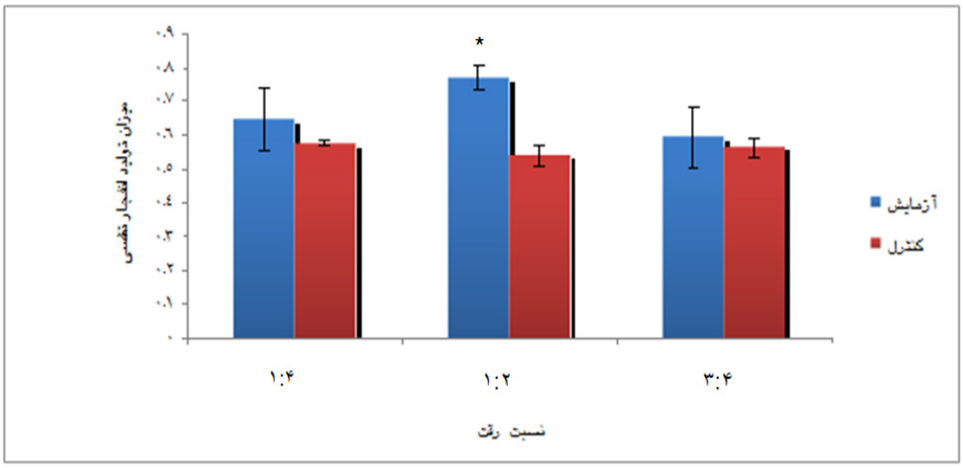
نمودار۲: مقایسه میزان بیگانه خواری نوتروفیل‌های تیمار شده با مایع رویی سلول در نسبت‌های مختلف در گروه‌های مورد مطالعه

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل(p<۰/۰٥)



نمودار۳: مقایسه میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل تیمار شده با سلول مزانشیم در گروه‌های مورد مطالعه

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل(p<۰/۰۵)



نمودار۴: مقایسه میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل‌های تیمار شده با مایع رویی سلول در سه نسبت مختلف در گروه‌های مورد مطالعه

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل(p<۰/۰۵)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول مزانشیم و فاکتورهای محلول آن بر عملکرد بیگانه خواری نوتروفیل مؤثر است. سلول مزانشیم باعث کاهش بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی در نوتروفیل شد که این اختلاف در مورد انفجار تنفسی معنی‌دار بود. درمقابل، فاکتورهای محلول ناشی از سلول مزانشیم میزان بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی را در نوتروفیل افزایش داده که این اختلاف در مورد فاگوسیتوز در هر سه نسبت مختلف معنی‌دار بود، اما در مورد انفجار تنفسی فقط در نسبت ۱:۲ معنی‌دار بود. سلول‌های مزانشیمال دارای نقش تنظیم عملکرد سیستم ایمنی می‌باشند، به طوری که در بررسی‌های متعددی این خصوصیت بیشتر در مورد ایمنی اکتسابی مطالعه شده است. با توجه به اطلاعات کمی که در مورد تأثیر سلول مزانشیم بر سیستم ایمنی ذاتی از جمله سلول

نوتروفیل وجود داشت، اقدام به انجام مطالعه حاضر شد. در مواردی، خواص آنتی باکتریال سلول‌های مزانشیمال به اثبات رسیده است(۱۲)، (TLR)[۱] به عنوان رسپتورهای سیستم ایمنی ذاتی در سطح طیف وسیعی از سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن‌های حرفه-ای و غیر حرفه‌ای نظیر سلول‌های مزانشیم بیان شده و طیف وسیعی از مولکول‌های مرتبط با پاتوژنیسیته را به عنوان لیگاند خود شناسایی نموده و در تنظیم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش ایفا می‌کنند. گرچه وجود TLR در این سلول‌ها مشخص شده و روشن است(۱۳)، که در پاسخ‌های التهابی دخالت دارند، اما نقش آن هنوز در ایمنی ذاتی به خوبی مشخص نشده است(۱٤). در اکثر موارد، عملکردهای مدیاتوری سیستم ایمنی سلول‌های مزانشیم، به وسیله ارتباط سلول- سلول و یا فاکتورهای محلول تنظیم می‌شود(۱۵). باتوجه به بررسی مطالعاتی که حاکی از نقش تنظیمی سیستم ایمنی به وسیله سلول مزانشیم دارد، این واکنش‌ها بیشتر مرتبط با ارتباط سلول - سلول می‌باشد و در مورد مایع رویی سلول اطلاعات کمی در دسترس است.

در این مطالعه هم سلول و هم مایع رویی سلول مزانشیمال رت به عنوان فاکتور اثرگذار مورد بررسی قرار گرفته است. درصد فاگوسیتوز در گروه تیمار مستقیم سلول مزانشیم با نوتروفیل در مقایسه با گروه کنترل تیمار شده با محیط کشت کاهش پیدا کرد، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. در مطالعه‌ای مشخص شده است که تیمار مستقیم سلول‌های مزانشیم انسانی بر نوتروفیل تأثیری بر فاگوسیتوز آنها نداشته و نیز تغییری در شیمو تاکسی و مهاجرت سلول نوتروفیل ایجاد نکرده است(۷). که تا حدی با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

از طرفی مایع رویی سلول مزانشیم در مقایسه با گروه کنترل، فاگوسیتوز مخمر را افزایش داد. میزان فاگوسیتوز در هر سه گروه با نسبت‌های ۱:٤، ۱:۲ و ۳:٤ افزایش یافت که این نسبت‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود، از طرفی در بین سه گروه با افزایش غلظت، میزان بیگانه خواری افزایش یافت که در بین گروه‌ها نسبت ۱:٤ با ۳:٤ اختلاف معنی‌دار داشت، اما نمی‌توان با اطمینان عنوان نمود که با افزایش دوز تیمار، درصد فاگوسیتوز افزایش می‌یابد. فرض بر این است که این تأثیر به دلیل تولید فاکتورهای محلول از جمله سایتوکاین‌ها می‌باشد. به طوری که در مطالعاتی نشان داده شده که سایتوکاین اینترکولین ٦ به وسیله سلول مزانشیم تولید می‌شود(۱٦) و در برخی منابع اثرات آنتی‌آپوپتوتیک سلول مزانشیمال را به دنبال تولید این سایتوکاین بیان کرده‌اند(۱۷). حفظ سلول نوتروفیل از فرآیند آپوپتوز می‌تواند تا حدی بر حفظ و تقویت عملکرد نوتروفیل مؤثر باشد. سنجش اسلایدی فاگوسیتوز مرحله‌ی بلع عامل بیگانه(مخمر) را بارز می‌کند، که نشانگر حذف کامل پاتوژن نبوده، بلکه فقط مراحل اولیه روند فاگوسیتوز را نشان می‌دهد. این نتیجه از نظر تأثیر مثبت مایع رویی سلول

۱-Toll-Like Receptors(TLR)

بر عملکرد نوتروفیل حائز اهمیت بوده و زمینه را برای بررسی مراحل بعدی فاگوسیتوز، یعنی انفجار تنفسی ایجاد می‌کند.

تولید گونه های فعال اکسیژن(ROS)[1] یک مرحله مهم در محدود سازی پاتوژن‌های مهاجم به وسیله نوتروفیل‌ها می‌باشد. اهمیت این مورد در بیماری گرانولوماتوز مزمن، که ناشی از نقص ژنتیکی در متابولیسم پراکسیداز در نوتروفیل‌هایی است که میکرواورگانیسیم را بلع نموده‌اند مشخص می‌شود(۱۸). سنجش میزان تولید واسطه‌های فعال اکسیژن، نشانگر دقیق‌تری از میزان فاگوسیتوز بوده که با تست NBT قابل اندازه گیري است. میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گروه تیمار نوتروفیل با سلول مزانشیم، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد.

به خوبی مشخص است که اشکالROS تحت کنترل چندین عامل محرک از راه‌های داخل سلولی مختلف بوده و به عنوان یک مرحله مهم در روند التهاب حایز اهمیت می‌باشد(۱۹). رافاگلو و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سلول مزانشیم انسانی، تولید ROS به وسیله نوتروفیل‌های در حال استراحت و تحریک شده با F-MLP[2] را کاهش می‌دهد که این کاهش در انفجار تنفسی، تغییری در فاگوسیتوز نوتروفیل‌های قرار گرفته در معرض زیموزان اپسونیزه ایجاد نکرده است. از طرفی، در بیمارانی که با سلول‌های بنیادی درمان شده اند خطر ابتلا به عوامل عفونت افزایش نیافته است(۷). نتایج این مطالعه نشان داد، مایع رویی سلول مزانشیم در هر سه نسبت باعث افزایش تولید ROS نسبت به گروه کنترل شده که این میزان فقط در نسبت ۱:۲ معنی‌دار بوده و در دو نسبت ۱:٤ و ۳:٤ معنی‌دار نبود. در بین گروه‌ها فقط نسبت ۱:۲ با نسبت ۳:٤ اختلاف معنی‌دار داشت که با توجه تأثیر مثبت مایع رویی سلول در نسبت ۱:۲، میزان انفجار تنفسی وابسته به دوز نیست. این واکنش را هم می‌توان به فاکتورهای محلول از جمله ساتوکاین‌ها ارتباط داد. با توجه به اثرگذاری مثبت مایع رویی سلول مزانشیمال رت بر افزایش فاگوسیتوز نوتروفیل، باید به این نکته توجه نمود که افزایش خارج از حد تولید واسطه‌های فعال اکسیژن می‌تواند باعث ایجاد عوارض پاتولوژیک مانند؛ سندروم دیسترس تنفسی، آرترواسکلروزیس، بدخیمی‌ها، آرتریت روماتوئید، بیماری‌های مرتبط با انسداد ریوی و ایسکمی‌شود(۲۰) که این مورد باید در راهکارهای درمانی با سلول‌های بنیادی مد نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تیمار سلول مزانشیمال رت و مایع رویی آن با سلول نوتروفیل بر عملکرد این سلول به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم ایمنی ذاتی و خط دفاع اولیه مؤثر می‌باشد که

۱-Reactive Oxygen Species(ROS)
۲-*N*-formylL-Methionin-L-leucyl-L-Phenylalanine(F-MLP)

این مورد را مـی‌تـوان هـم بـه عنـوان یـک اسـتراتژی درمانی در بیماری‌های مرتبط با عملکرد نوتروفیل بـه کار برد و هم پاسخ فیزیولوژیک و حتی پاتولوژیک در سـلول درمـانی بـا اسـتفاده از سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی را در نظر گرفت. این مطالعه زمینه بررسـی بیشـتر و دقیـق‌ترعوامـل تأثیرگـذار در تـأثیر سـلول مزانشـیم و مـایع رویـی حاصـل از آن بـر عملکـرد نوتروفیل را فراهم می‌کند.

تقدیر و تشکر

مطالعـه حاضـر حاصـل پایـان نامـه مقطـع کارشناسی ارشد ایمنی شناسـی بـود کـه بـا همکـاری مرکز کشت سلول دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت.

REFRENCES:

۱.Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest ۲۰۰۶; ۱۱۶(۵): ۱۱۹۵-۲۰۱.

۲.Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Piriea A. The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micro mass culture system. Yakhteh ۲۰۰۶; ۸:۱۶۲-۷۱.

۳.Zech NH. Adult stem cell Manipulation and possible clinical perspectives. Repoduc Med Endocrinol ۲۰۰۴; ۲: ۹۱-۹.

۴.Pittenger MF, Makay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science ۱۹۹۹; ۲۴۸(۵۴۱۱): ۱۴۳-۷.

۵.Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, F Lam EWF, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood ۲۰۰۵; ۱۰۵(۷): ۲۸۲۱–۷.

۶.Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EWF, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentation and fuction by preventing entry into the cell cycle. Transplantation ۲۰۰۷; ۸۳(۱): ۷۱–۶.

۷.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 ۲۰۰۸; ۲۶: ۱۵۱–۶۲.

۸.Mark T. Quinn Frank R. DeLeo Gary M. Bokoch. Neutrophil Methods and Protocols, Humana Press Inc, Totowa New Jersey ۲۰۰۷; ۰۷۵۱۲: ۷.

۹.Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, OLIVEIRA APE, Deffune E. Isolation of Bone Marrow mesenchymal stem cells. J Acta Ortop Bras ۲۰۰۶; ۱۴(۱): ۲۲-۴.

۱۰.Rezapour A, Majidi J. An improved method of neutrophil isolation in peipheral blood of sheep. J Animal and Veterinary Advances ۲۰۰۹; ۸(۱): ۱۱-۵.

۱۱.Delirejh N, Morshedi A, Athari SS. Survey of the effect of powder nigella sativa (black seed)in increscent of monocyte phagocytosis in quinea pig. Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal ۲۰۱۰; ۱۶(۴): ۵۵-۶۴.

۱۲.Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigenpresenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood ۲۰۰۵; ۱۰۵(۵): ۲۲۱۴–۹.

۱۳.Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood ۲۰۰۵; ۱۰۵(۱۰): ۴۱۲۰–۶.

۱۴.Karsnooembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-۳۷. Stem Cells ۲۰۱۰; ۲۸: ۲۲۲۹–۳۸.

۱۵.Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors ۳ and ۴ are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T cell modulatory activity by impairing Notch signaling. Stem Cells ۲۰۰۸; ۲۶(۱): ۲۷۹–۸۹.

۱۶.Nemeth K, Mayer B, Mezey E. Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. J Mol Med ۲۰۱۰; ۸۸: ۵–۱۰.

۱۷.Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Exp Cell Res ۲۰۰۶; ۳۱۲: ۲۱۶۹ –۷۹.

۱۸.Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. Stem Cells ۲۰۰۷; ۲۵(۱۰): ۲۶۳۸ –۴۷.

۱۹.Asensi V, Valle E, Meana A, Fierer J, Celada A, Alvarez V, et al. In vivo interleukin-۶ protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. Infect Immun ۲۰۰۴; ۷۲(۷): ۳۸۲۳–۸.

۲۰.Dinauer MC, Orkin SH. Chronic granulomatous disease. Annu Rev Med ۱۹۹۲; ۴۳: ۱۱۷–۴.

۲۱.Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. Free Radic Biol Med ۲۰۰۷; ۴۲: ۱۵۳–۶۴.

۲۲.Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med ۲۰۰۰; ۱۰۹: ۳۳–۴۴.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The effect of Rat mesenchymal stem cells and its soluble factors on peripheral blood neutrophil function

Hamounnavard[۱] S, Delirezh N*

Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Received: ۱۳ Aug ۲۰۱۳ Accepted: ۱۵ Oct ۲۰۱۳

Abstract

Background & aim: Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of adult stem cells which is an appropriate source for therapeutic purposes. The aim of this study was to investigate the effects of rat mesenchymal cells and soluble factors on the function of peripheral blood neutrophils.

Methods:This experimental study was conducted on rat mesenchymal stem cells. Mesenchymal cells obtained from bone marrow of the femur and Tybaof ۶-۸ week rats and were cultured in DMEM. After maturation, the mesenchymal cells and supernatant at ratios of ۱:۴, ۱:۲ and ۳:۴ were adjacent with peripheral blood neutrophil phagocytosis. Subsequently, the respiratory burst of neutrophils, the yeast phagocytosis and nitroblue tetrazolium test was evaluated for revival. The Data were analyzed by t-tests, ANOVA and Tukey's test (p <۰,۰۵).

Results: The rates of phagocyted neutrophil treated with MSCs compared to controls were decreased.This reduction was not statistically significant (p >۰,۰۵).The phagocitic cell in the rats of the treated group with supernatant compared to the control group in all three ratios of ۱:۴, ۱:۲, ۳:۴ increased significantly (p>۰,۰۵). by the increase in the ratio was observed (P>۰,۰۵). Respiratory burst of neutrophils treated with mesenchymal stem cells compared to the control group significantly decreased. Respiratory burst was increased in the groups treated with cell supernatant at ratios of ۱:۲ only (P>۰,۰۵).

Conclusion: Mesenchymal cell-cell interaction with neutrophils was remarkable for therapeutic strategies in diseases associated with neutrophil function in response to physiological and pathological cell therapy with MSCs.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Soluble Factors, Neutrophil Phagocytosis

Corresponding author: Delirezh N, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran
Email: n.delirezh@urmia.ac.ir