

Modulate the Effects of the Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells' Supernatant on Neutrophil Functions by 17-beta Estradiol

Nekoeii Z.¹ BSc, Afzal Ahangran N.* PhD, Delirejh N.¹ PhD

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

¹Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Aims: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells have therapeutic potentials due to their immunomodulatory properties. Estrogen is also an immunomodulator. The current study was to analyze the effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells' supernatant of male rats adjacent with estrogen on the function and survival of neutrophils.

Materials & Methods: In this experimental study, mesenchymal stem cells isolated from the femur and tibia of the bone marrow of male 6-8 week old rats were cultured in DMEM. After maturation, the supernatant of the mesenchymal stem cells treated with estrogen (10nM and 20nM) and cultured for 72 hours at 37°C. Then, the mesenchymal stem cells were co-cultured with the peripheral blood neutrophils and the neutrophil functions were measured by phagocytosis and respiratory burst (Nitro Blue Tetrazolium resuscitation) tests. The viability of neutrophils was measured with acridine-orange fluorescent staining. Data were analyzed by SPSS 18 software, using independent T, one way ANOVA and Tukey tests.

Findings: The respiratory burst in the groups treated with 10nM and 20nM of estrogen showed significant difference compared with the control group. The percentage of phagocytosis in the groups treated with 10nM and 20nM of estrogen were significantly increased compared with the control group. There was a significant difference between the percentage of phagocytosis of 10nM and 20nM groups ($p < 0.05$). The apoptosis level in the groups treated with 10nM and 20nM of estrogen showed significant difference compared with the control group.

Conclusion: Supernatant of mesenchymal stem cells treated with estrogen increases the phagocytosis potential and respiratory explosion of neutrophils.

Keywords

Mesenchymal Stromal Cells [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68059630>];

Estrogens [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004967>];

Neutrophils [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009504>]

* Corresponding Author

Tel: +984432770508

Fax: +984432771926

Address: Microbiology Department, Veterinary Faculty, Nazlu Pardis, Kilometer 11 of Sarv Road, Urmia, Iran
n.a.ahangran@gmail.com

Received: November 25, 2014

Accepted: May 10, 2015

ePublished: June 20, 2015

تعدیل اثرات مایع رویی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بر عملکرد نوتروفیل‌ها توسط ۱۷-بتا استرادیول

زهرا نکویی BSc

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

ناهیده افضل آهانگران* PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

نوروز دلیرز PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اهداف: سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان به دلیل خاصیت تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی، دارای پتانسیل درمانی هستند. استروژن نیز نوعی تنظیم‌کننده سیستم ایمنی است. هدف مطالعه حاضر، بررسی تاثیر مایع رویی حاصل از سلول‌های مزانشیمی رت نر مجاورشده با استروژن، بر عملکرد و میزان زنده‌مانی نوتروفیل بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده از مغز استخوان فمور و تییبای موش صحرایی نر ۸-۶ هفته‌ای در محیط کشت اختصاصی کشت داده شد. پس از بلوغ، مایع رویی حاصل از سلول‌های مزانشیمی با استروژن ۱۰ و ۲۰ نانومولار به مدت ۷۲ ساعت و در ۳۷°C تیمار شد. سپس سلول‌های مزانشیمی با نوتروفیل خون محیطی مجاور شد و عملکرد نوتروفیل با آزمون فاگوسیتوز مخمر و انفجار تنفسی (احیای نیتروبولوتترازولیوم) مورد سنجش قرار گرفت. میزان زنده‌مانی نوتروفیل با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت اکریدین-اورنج محاسبه شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون‌های T مستقل، آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی آنالیز شدند.

یافته‌ها: میزان انفجار تنفسی در گروه‌های تیمار شده با دوز ۱۰ نانومولار و ۲۰ نانومولار استروژن نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت. درصد فاگوسیتوز بعد از تیمار با دوزهای ۱۰ نانومولار و ۲۰ نانومولار، نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار بود. بین درصد فاگوسیتوز دوزهای ۲۰ نانومولار و ۱۰ نانومولار نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). میزان آپوپتوز در گروه ۱۰ نانومولار و ۲۰ نانومولار نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: مایع رویی سلول‌های مزانشیمی مجاورشده با استروژن قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهند.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های مزانشیمی، استروژن، نوتروفیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

*نویسنده مسئول: n.a.ahangran@gmail.com

مقدمه

مغز استخوان دارای دو نوع سلول است؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) و سلول‌های خون‌ساز یا هماتوپویتیک [۱]. MSC سلولی است با توانایی تقسیم زیاد که تحت شرایط مناسب قادر است به انواعی از سلول‌های تخصص‌یافته مانند استخوان، غضروف و چربی تمایز یابد [۲]. MSCها "در شیشه" سبب مهار تولید پروکسید هیدروژن در نوتروفیل‌های فعال شده، می‌شوند، بنابراین می‌توانند به‌طور بالقوه شدت انفجار تنفسی را تحت شرایط التهابی محدود کنند [۳]. فاکتورهای محلول مختلفی از MSC ترشح می‌شوند که گفته می‌شود نقش فعالی در سرکوب عملکردهای MSC دارد. اینترلوکین-۱۰ یک سایتوکاین ضدالتهابی است که در بسیاری از پروسه‌های سرکوبگری نقش دارد، بنابراین یک عامل مهم حیاتی در جلوگیری از التهاب و بیماری‌های اتوایمیون محسوب می‌شود [۴]. اینترلوکین-۶ (IL-6) سایتوکاین دیگری است که می‌تواند به‌وسیله MSC تولید شود و روی اثرات ایمنولوژیک MSC اثر بگذارد و می‌تواند نوتروفیل‌ها را از آپوپتوز محافظت کند [۳]. از فاکتورهای دیگر می‌توان TGFβ (فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده بتا)، نیتریک اکسید، PGE (پروستاگلاندین E)، HLA-G5 (آنتی‌ژن گلوبول سفید انسانی) محلول، گالکتین ۳ و HGF (فاکتور رشد هیپاتوسیت) را نام برد [۵]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که MSC ممکن است از القای آپوپتوز در لنفوسیت‌ها محافظت کند و حتی مشاهده شده است که می‌تواند تیموسیت‌ها و سنتروبلاست‌ها را از آپوپتوز خودبه‌خودی محافظت نماید و همچنین آنها را در مقابل مرگ القا شده از مسیر Fas [۶] محافظت می‌کند. بررسی اثر استروژن بر تولید سایتوکاین به‌وسیله سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی محلول رویی کشت سلولی با یا بدون آن بررسی شد که تیمار با استروژن افزایش اینترلوکین ۱۰ را به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌وسیله سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) نشان داد و نیز استروژن علاوه بر اینکه دارای نقش تحریکی بر سیستم ایمنی است، نقش سرکوب‌کننده هم دارد [۷]. استروژن از آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان سینه جلوگیری می‌کند و از طرفی سبب افزایش بیان پروتئین Bcl2 می‌شود که این پروتئین اثر ضدآپوپتوزی دارد [۸]. با توجه به اینکه دانش سلول‌های بنیادی رو به افزایش است، واکنش سلول‌های بنیادی با سلول‌های ایمنی قابل توجه است که در زمینه ایمنی اکتسابی و تا حدی ایمنی ذاتی مطالعاتی صورت گرفته است. استروژن به‌عنوان مدیاتور مهم در سیستم ایمنی شناخته می‌شود و با توجه به اینکه نوتروفیل‌ها اولین خط دفاعی بدن هستند و نیز نقش سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها، واکنش متقابل این دو گروه از سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است تا بتوان از نتایج به‌دست‌آمده این مطالعه در درمان بیماری‌های مرتبط با استفاده از تکنیک سلول‌درمانی استفاده کرد و زمینه

سنجش زنده‌مانی نوتروفیل در مواجهه با محلول روی سلول مزانشیم: برای سنجش زنده‌مانی نوتروفیل در مواجهه با محلول رویی سلول‌های مزانشیمی از کیت آنکسین- پروپیدیوم‌دید (Sigma Aldrich, Cat NO: 51-6710AK؛ ایالات متحده) استفاده شد. پس از دو بار شست‌وشوی سلول نوتروفیل انکوبه‌شده با محلول رویی سلول مزانشیم، در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، سلول‌ها در یک میلی‌لیتر بایندینگ‌بافر با تراکم 3×10^6 در میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیون تهیه شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق با ۵ میکرولیتر اکریدین‌اورنج (سیگما؛ ایالات متحده) و ۵ میکرولیتر PI (پروپیدیوم‌دید) ترکیب شده و در محیط تاریک و دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بایندینگ‌بافر به میکروتیوپ، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فوق با PBS (سیگما؛ ایالات متحده) رقیق شده و میزان زنده‌مانی (درصد سلول سالم، آپوپتوز و نکروز شده) توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد آنالیز قرار گرفت [۱۳، ۱۴].

آزمایش فاگوسیتوز نوتروفیل: به‌طور خلاصه، در این آزمایش ابتدا سرم موش صحرایی مورد آزمایش جدا شده و با مخمر اپسونیزه می‌شود و این مخمر به‌عنوان آنتی‌ژن در مجاورت نوتروفیل مجاورشده با مایع رویی سلول مزانشیم که خود با استروژن تیمار شده است، قرار می‌گیرد. یک نمونه هم به‌عنوان کنترل است که با استروژن تیمار نشده است. پس از نیم ساعت انکوباسیون در 37°C با رنگ گیمسا (مرک؛ آلمان) رنگ‌آمیزی صورت گرفته و با توجه به درصد نوتروفیل‌ها که مخمر را فاگوسیتوز کرده‌اند میزان فاگوسیتوز با روش اسلایدی در زیر میکروسکوپ نوری بررسی می‌شود [۱۵].

آماده‌کردن مخمر: برای انجام این آزمایش از مخمر *کاندیدا آلبیکنس* استفاده می‌شود. این مخمر از ۲۴ ساعت قبل کشت داده شد تا تازه باشد. سپس مقداری از این کشت در بافر PBS حل شد و با ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و شست‌وشو داده شد. این عمل دو بار انجام شد و در آخر میزان 1×10^6 در میلی‌لیتر به‌منظور اپسونیزاسیون در محیط کشت (Sigma RPMI) Aldrich؛ ایالات متحده) که دارای ۱۰٪ سرم تازه موش صحرایی نر است، به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوباسیون شد [۱۴].

آپوپتوز: به‌طور خلاصه، نوتروفیل با مایع رویی سلول‌های مزانشیم تیمار شده و نشده با استروژن به مدت ۴ ساعت مجاور شد. پس از این مدت در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و به‌مقدار 1×10^6 اکریدین‌اورنج اضافه و ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای 37°C انکوباسیون شد. سپس مقداری محیط کشت روی آن ریخته و دو بار در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی خالی و به پلیت سلولی ته محلول مقدار 1×10^6 از PI اضافه و ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. سپس مقداری محیط روی آن ریخته در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ

بیشتری از مطالعات را در ارتباط با ایمنی ذاتی و سلول‌های بنیادی فراهم نمود.

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر مایع رویی حاصل از سلول‌های مزانشیمی موش صحرایی نر مجاورشده با استروژن، بر عملکرد و میزان زنده‌مانی نوتروفیل انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول بنیادی مزانشیم: مراحل کشت و تشخیص براساس بررسی از قبل انجام گرفته و پروتکل بیتن‌کورت و همکاران [۹] انجام شد. موش‌های صحرایی از طریق قرار گرفتن در ظرف حاوی دی‌اتیل‌اتر آسان‌کشی شدند و سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان فمور و تیبیای موش صحرایی ۸-۶ هفته‌ای، با عمل فلاشینگ سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (سیگما؛ ایالات متحده) استحصال و پس از سانتریفوژ ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و پس از شمارش سلولی به همراه FBS (سرم جنین گوساله) ۱۵٪ با دمای 37°C و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. اولین تعویض کشت پس از ۷۲ ساعت و سپس هر ۳ روز یک بار انجام شد. مطالعه از نظر رعایت اخلاق در پژوهش با دستورالعمل انجمن حمایت از حیوانات مطابقت داشت.

جداسازی نوتروفیل: جداسازی با استفاده از روش رضابور و مجیدی [۱۰] انجام گرفت. به‌طور خلاصه در این روش، نمونه خون محیطی هپارینه (۱۰ واحد بر میلی‌لیتر) مستقیماً از قلب موش صحرایی گرفته شد. سپس خون به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ رقیق شده و سپس به آرامی بر مگلو مین ۲۵٪ (شرکت داروپخش؛ ایران) لود شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت سلولی ته‌فالكون دو مرتبه توسط آب مقطر لیز شده و پس از اضافه‌نمودن سرم فیزیولوژی ۲/۵۵٪ به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت با شست‌وشوی پلیت سلولی با سرم دکستروز ۵٪ (سیگما؛ ایالات متحده) به میزان 4×10^6 در میلی‌لیتر همگن شد.

مجاورسازی مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تیمار شده با بتا استرادیول با سلول‌های نوتروفیل: پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی تیمار شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با استروژن ۱۰ و ۲۰ نانومولار [۱۱] موجود در فلاسک در یک لوله فالكن ۱۵ میلی‌لیتر استریل جمع‌آوری شد. مایع رویی حاصله به یک پلیت ۲۴ خانه ته‌تخت انتقال داده شد، به طوری که کف خانه‌ها با مایع رویی پوشانده شد. سپس 5×10^6 میلی‌لیتر سلول نوتروفیل به همراه FBS ۱۰٪ به داخل هر خانه حاوی مایع رویی اضافه شد و سپس به مدت ۴ ساعت تحت شرایط 37°C و ۵٪ CO_2 و رطوبت ۸۰٪ انکوبه شدند. بعد از گذشت مدت زمان انکوباسیون، نوتروفیل‌ها برای انجام آزمون‌های تکمیلی جداسازی شدند [۱۲].

شد. از پلیت سلولی لام تهیه و سلول‌های زنده و مرده (نکروز و آپوپتوز) با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد [۳].

روش انجام آزمایش بیگانه‌خواری: برای انجام این آزمایش از مخمر *کاندیدا آلیکنس* استفاده می‌شود. این مخمر از ۲۴ ساعت قبل کشت داده شد تا تازه باشد. سپس مقداری از این کشت در بافر PBS حل شد و با دور ۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و شست‌وشو داده شد. دو مرتبه این عمل انجام شد و در آخر میزان 1×10^6 در میلی‌لیتر به منظور اپسونیزاسیون در محیط کشت RPMI که دارای ۱۰٪ سرم تازه موش صحرایی نر است، به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوباسیون شد [۱۴]. 100 لانداسوسپانسیون نوتروفیل به مدت ۲ ساعت با مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با استروژن و نیز نمونه کنترل، مجاور شد. سپس از این سوسپانسیون روی لام استریل ریخته و 100 میکرولیتر از مخمر اپسونیزه شده به آن اضافه شد تا مخمر در دسترس نوتروفیل قرار گیرد. این لام به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شد. پس از این زمان و خشک شدن لام، با فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین رنگ شد و در زیر میکروسکوپ نوری با لنز ۴۰، حداقل ۵ میدان میکروسکوپی برای هر لام مورد بررسی قرار گرفت و درصد نوتروفیل‌هایی که مخمر را فاگوسیتوز کرده‌اند، محاسبه شد [۱۴].

آزمایش احیای نیتروبولوترازولیوم (NBT): این آزمایش برای سنجیدن میزان تولید واسطه‌های فعال اکسیژن در سلول نوتروفیل است. برای این آزمایش مقدار 15 میکرولیتر از نوتروفیل‌هایی که مرحله بیگانه‌خواری با مخمر را انجام داده‌اند با تراکم 4×10^6 در میلی‌لیتر با 15 میکرولیتر از محلول NBT که همزمان با انجام این آزمون از ترکیب زایموزان (سیگما؛ ایالات متحده) و پودر NBT (سیگما؛ ایالات متحده) و محیط RPMI (سیگما؛ ایالات متحده) تهیه می‌شود در داخل یک میکروتیوپ مخلوط می‌شود. این محلول به مدت یک ساعت در دمای 37°C انکوباسیون شد و بعد از این مرحله 400 میکرولیتر محلول N-N-دی‌متیل‌فورماید (سیگما؛ ایالات متحده) به این سوسپانسیون افزوده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با دمای 4°C و ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از این مرحله مقدار 200 میکرولیتر از مایع رویی هم از نمونه کنترل هم نمونه تیمار شده با استروژن برداشته و در چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد. سپس دانسیته نوری محلول رویی در طول موج 520 نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد [۱۴].

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 آنالیز شد و از آزمون‌های T مستقل، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی برای گروه محلول رویی سلول مزانشیمی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین آماری در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ بیان شدند.

یافته‌ها

میزان آپوپتوز مایع رویی در گروه تیمار شده با استروژن با دوز 10 نانومولار ($52/9 \pm 2/1$) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ($41/16 \pm 2/1$) نشان داد ($p < 0/05$). به علاوه گروه تیمار شده با استروژن با دوز 20 نانومولار ($62/4 \pm 4/2$) در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0/01$). اما بین دوزهای 20 نانومولار و 10 نانومولار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. درصد فاگوسیتوز در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی بعد از تیمار با هر دو دوز 10 نانومولار ($p < 0/01$) و 20 نانومولار ($p < 0/001$) استروژن، در مقایسه با گروه کنترل ($15/7 \pm 1/1$) دارای افزایش معنی‌دار بود. از طرف دیگر، بین دوزهای 20 نانومولار ($3/9 \pm 0/4$) و 10 نانومولار ($9/1 \pm 1/3$) نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$).

میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل مجاور شده با مایع رویی سلول‌های مزانشیمی در گروه تیمار شده با دوز 10 نانومولار استروژن ($0/504 \pm 0/038$) در مقایسه با گروه کنترل ($0/613 \pm 0/021$) دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/05$). گروه تیمار شده با دوز 20 نانومولار استروژن ($0/472 \pm 0/029$) نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/01$). اما این اختلاف بین دوزهای 20 نانومولار و 10 نانومولار استروژن معنی‌دار نبود.

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط داخلی مغز استخوان در ارتباط نزدیک با سلول‌های نوتروفیل قرار می‌گیرند [۱۴، ۱۵]. سلول‌های نوتروفیل بالغ، محیط داخلی مغز استخوان را ترک کرده و به سمت خون حرکت می‌کنند. با این وجود ارتباط مستقیم بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نوتروفیل‌های بالغ در محیط داخلی مغز استخوان به طور دقیق شرح داده نشده است. به نظر می‌رسد که این سلول‌ها در حفاظت سلول‌های نوتروفیل از مرگ زودرس و مهار فعال‌سازی آنها در محیط داخلی مغز استخوان نقش دارند [۱۴]. البته در بافت‌های طبیعی نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی اختصاصی آن بافت حضور دارند [۱۶]. این سلول‌ها عمدتاً در نواحی مختلفی از قبیل نواحی اطراف سلول‌های اندوتلیال (پری‌اندوتلیال) و نواحی اطراف عروقی (پری‌واسکولار) قرار گرفته‌اند [۱۷]. کشت سلول‌های نواحی اطراف عروقی مشتق از بافت‌های مختلف، یک فنوتیپ مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان را نشان می‌دهد [۱۸]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش ایمنومودلاتوری در مکانیزم‌های دفاعی اصلی در برابر واکنش‌های مضر سیستم ایمنی را از خود نشان می‌دهند و بدین ترتیب به عنوان رابط بین محیط داخلی مغز استخوان و خون در موجود زنده عمل می‌کنند. اثرات تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیازمند فعال‌سازی اولیه آنها با سلول‌های سیستم ایمنی از قبیل

نوتروفیل‌ها و تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی این سلول‌ها مانند TNF α (فاکتور نکروزکننده تومور آلفا) و اینترلوکین-۱ است [۱۹]، [۲۰].

بعد از فعال‌سازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه تولید فاکتورهای محلول از قبیل نیتریک‌اکساید، پروستاگلاندین E₂، اندولامین ۳، ۲، دی‌اکسیژناز و IL-6 و مولکول‌های تنظیم‌کننده شامل گالکتین‌ها، PDL1، TGF β و HLA-G، نقش سرکوب‌کننده‌ای را روی سیستم ایمنی بازی می‌کنند [۲۳-۲۱]. مطالعات انجام‌شده نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقیم در بافت در فراخوانی سلول‌های نوتروفیل و افزایش قابلیت‌های التهابی آنها به‌دنبال چالش میکروبی دارای نقش اساسی هستند [۱۶]. بنابراین به‌نظر می‌رسد ریزمحیطی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آن قرار گرفته‌اند، در نهایت بر وضعیت سلول‌های نوتروفیل مرتبط با آنها موثر خواهد بود. تحقیقات نشان می‌دهد که استروژن بر عملکرد سیستم ایمنی اثر دارد [۲۴، ۲۵]. این هورمون یکی از اعضای خانواده هورمون‌های استروئیدی است. همه اعضای این خانواده در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند [۱۴]. مشخص شده که عملکردهای مدیاتوری سیستم ایمنی روی سلول‌های بنیادی مزانشیم، توسط ارتباط سلول-سلول یا فاکتورهای محلول تنظیم می‌شود [۷]. با توجه به بررسی مطالعاتی که حاکی از نقش تنظیمی سیستم ایمنی توسط سلول مزانشیم هستند، این واکنش‌ها بیشتر مرتبط با ارتباط سلول-سلول بوده و در مورد مایع رویی سلول اطلاعات کمی در دسترس است.

استرادیول همراه با پروژسترون سبب افزایش بقای نوتروفیل می‌شود که این عمل از طریق تأخیر در آپوپتوز با کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ صورت می‌گیرد [۲۶].

هموستاز سلول‌های نوتروفیل در بدن توسط آپوپتوز تنظیم می‌شود. حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از افراد سالم در کنار سلول‌های نوتروفیل به‌نسبت یک به ۵۰۰ به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل در حال استراحت، نوتروفیل‌های فعال‌شده با اینترلوکین-۸ و نوتروفیل‌های فعال‌شده با تری‌پتید N-فورمیل-L-متیونین-L-لوسیل-L-فنیل‌آلانین شده است [۲۷]. عملکرد مشابهی نیز در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت‌های محیطی گزارش شده است [۱۸]. تحقیقات بیشتر مشخص نموده است که IL-6 تولیدشده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجب افزایش بقا و مهار آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل می‌شود [۱۴]. IL-6 موجب کاهش سطح پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و افزایش پروتئین ضدآپوپتوزی mcl-1 در سلول‌های نوتروفیل می‌شود [۲۶، ۲۷].

در تحقیقات اخیر [۲۶] نشان داده شده است که استروژن بر سلول‌های مزانشیم موش صحرایی اثر می‌گذارد و با افزایش بیان ژنومی مولکول‌های BCL-2 و BCL-XL سبب ممانعت از عمل

در منابع دیگری گفته شده است که تولید IL-6 سبب ایجاد اثرات آنتی‌آپوپتوتیک می‌شود که در حفظ و تقویت عملکرد نوتروفیل اثر می‌گذارد. در مطالعه ما نیز مشاهده شده است که تیمار سلول مزانشیم و مایع رویی آن با استروژن سبب افزایش فاگوسیتوز در نوتروفیل شده است که می‌توان گفت احتمالاً این اثر به‌دلیل تولید IL-6 است. سلول‌های مزانشیم با فعال‌سازی فاکتور نسخه‌برداری STAT-3 سبب تولید IL-6 می‌شوند. مطالعات قبلی نشان داده است که IL-6 موجود در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی مانع تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد انفجار تنفسی در سلول‌های نوتروفیل بدون تیمار یا تیمار شده با f-MLP می‌شود [۱۴]. بنابراین کاهش شدت آزمون NBT که در مطالعه حاضر در ارتباط با مایع رویی مشاهده شد ممکن است از این طریق صورت گرفته باشد. هنگامی که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌صورت لجام‌گسیخته در نوتروفیل‌ها افزایش پیدا می‌کند موجب تشدید ضایعات ایمونوپاتولوژیک ایجادشده توسط سلول‌های نوتروفیل می‌شود [۲۷]. با توجه به اینکه تیمار با مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تحت تأثیر استروژن موجب افزایش قابلیت فاگوسیتوز در همراهی با کاهش آزمون NBT شده است می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نوتروفیل‌ها یک فنوتیپ ضدالتهابی پیدا کرده و می‌توانند به‌دلیل افزایش قابلیت فاگوسیتوز بدون ایجاد آسیب بافتی در فرآیندهای ترمیم بافت مشارکت کنند.

نتایج مطالعه حاضر به‌طور جالب توجهی نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با استروژن به‌دنبال مجاورت مستقیم سلولی موجب افزایش معنی‌دار قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل شده است که لازم است در این زمینه در مطالعات آینده تحقیقات بیشتری صورت پذیرد. با توجه به نقش تنظیمی استروژن و سلول مزانشیم بر عملکرد سیستم ایمنی، برهم‌کنش نوتروفیل با مایع رویی حاصل از سلول مزانشیمی می‌تواند در رویکردهای درمانی و مداخله‌گر هورمونی مورد توجه قرار گیرد. سلول مزانشیم مجاورشده با استروژن بر عملکرد نوتروفیل‌ها تأثیر قابل توجهی دارد که از این نظر می‌تواند در درمان بیماری‌های مرتبط با عملکرد نوتروفیل‌ها و پاسخ‌های فیزیولوژیک و حتی

- 12- Esmaili Gouvarchin Galeh H, Delirezh N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. *Turk J Biol.* 2014;38(3):365-70.
- 13- Turina M, Miller FN, Mc Hugh PP, Cheadle WG, Polk HC. Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. *Inflammation.* 2005;29(1):55-63.
- 14- Ghoseiri R, Alizadeh S, Mojtahedzadeh F, Najafi Poor H. Survey of the effect of powder nigella sativa (black seed) in increscent of monocyte phagocytosis in quinea pig. *Horizon Med Sci.* 2010;16(3):55-64. [Persian]
- 15- Hamaliaka A, Novikova I. Nitric oxide production disorders in leukocytes of patients with recurrent furunculosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(2):367-72.
- 16- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105(7):2821-7.
- 17- Corcione A1, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
- 18- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107(4):1484-90.
- 19- 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. *J Leukoc Biol.* 2010;88(5):1005-15.
- 20- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
- 21- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105(5):2214-9.
- 22- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):2.
- 23- Maby El Hajjami H, Amé Thomas P, Pangault C, Tribut O, De Vos J, Jean R, et al. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: Role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res.* 2009;69(7):3228-37.
- 24- Ansar Ahmed S, Dauphinée MJ, Montoya AI, Talal N. Estrogen induces normal murine CD5+B cells to produce autoantibodies. *J Immunol.* 1989;142(8):2647-53.
- 25- Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, Schütze N, Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;139:252-61.
- 26- Blesson CB. Estrogen receptors in leukocytes-possible impact on inflammatory processes in the female reproductive system. In: Aimaretti G, Marzullo P, Prodam F, (editors). *Endocrinology and metabolism update on mechanisms of hormone action: Focus on metabolism, growth and reproduction.* Rijeka, Croatia: InTECH; 2011.
- 27- Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010;28(12):2229-38.

پاتولوژیک نوتروفیل‌ها در عمل متقابل با سلول‌های مزانشیمی مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مایع رویی سلول‌های مزانشیمی مجاورشده با استروژن قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهند.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از زحمات و همکاری کلیه مسئولان و کارکنان ذی‌ربط بخش ایمنی‌شناسی و مرکز کشت سلول دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر از نظر رعایت اخلاق در پژوهش با دستورالعمل انجمن حمایت از حیوانات مطابقت داشت.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد بوده که با همکاری مرکز کشت سلول دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

منابع

- 1- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1195-201.
- 2- Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(240):270-80.
- 3- 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.
- 4- O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:114-31.
- 5- Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361(3):745-50.
- 6- Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells.* 2007;25(7):1753-60.
- 7- Gaillard RC, Spinedi E. Sex-and stress-steroids interactions and the immune system: Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest Anim Endocrinol.* 1998;15(5):345-52.
- 8- Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis in autoimmune diseases. *Curr Med Chem.* 2005;4(4):429-37.
- 9- Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune E. Isolation of Bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(1):22-4.
- 10- Rezapour A, Majidi J. An improved method of neutrophil isolation in peripheral blood of sheep. *J Anim Vet Adv.* 2009;8(1):11-5.
- 11- Hashemi M, Ghavami S. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on proliferation of human breast cancer cell lines. *Tabib-E-Shargh.* 2005;7(1):21-9. [Persian]