● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۳، ص۲۲۸-۲۱۸، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

# تولید نیتریک اکسید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحریک شده با زیموزان و القای آپوپتوز در سلول T توسط این سلول‌ها

الهام دارابی[1*]، احمد مرشدی[2]، امیر توکمه‌چی[3]، نوروز دلیرژ[4]

**خلاصه**

**مقدمه:** سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stem cells یا MSCs) که می‌توان آن‌ها را سلول‌های استرومایی چند ظرفیتی مزانشیمال نامید، جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها هستند که در محیط آزمایشگاهی با چسبندگی به سطوح پلاستیکی تکثیر می‌یابند. فعال شدن گیرنده‌های شبه تول (Toll-like receptors یا TLR) یکی از اولین حسگرهای ایمنی ذاتی و تنظیم کننده فعالیت‌های ایمونومدولاتوری MSCها است. هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر زیموزان بر پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی با تولید نیتریک اکسید و القای آپوپتوز در سلول‌های T بود.

**روش:** سوسپانسیون سلولی تهیه شده از استخوان فمور و تیبیا به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تمایل به چسبیدن به فلاسک صورت گرفت. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم ۷۰ درصد توسط آگونیست $TLR_2$ (زیموزان) در دو دوز ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و سپس سلول‌های مجاور شده با هر دو دوز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۱ و ۱۲ ساعت انکوبه شدند. مایع رویی سلول‌ها جهت اندازه‌گیری نیتریک اکسید جمع‌آوری و درصد آپوپتوز القا شده در سلول‌های T به روش فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی AO/PI (Acridine orange-Propidium iodide) اندازه‌گیری گردید.

**یافته‌ها:** سلول‌هایی که به مدت ۱ ساعت با ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیموزان انکوبه شده بودند، در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را در القای آپوپتوز سلول‌های T نشان دادند ($P \leq ۰/۰۵$). همچنین افزایش معنی‌داری در تولید نیتریک اکسید سلول‌های تیمار شده با دوز فوق در مدت ۱۲ ساعت انکوباسیون مشاهده شد ($P \leq ۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** بر پایه یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که دوزهای مختلف، نوع آگونیست TLR و مدت زمان انکوباسیون بر میزان تولید نیتریک اکسید و القای آپوپتوز در سلول‌های T فعال شده تأثیرگذار است.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، نیتریک اکسید، زیموزان

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۲- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۴- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** elidarabi@ymail.com

**دریافت مقاله:** ۱۳۹۲/۴/۱۰ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۳/۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۴/۱۰

**مقدمه**

سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stem cell یا MSCs) که سلول‌های استرومایی چند ظرفیتی مزانشیمال نیز نامیده می‌شوند، جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها هستند که در محیط آزمایشگاهی و با چسبندگی به سطوح پلاستیکی تکثیر می‌یابند. در محیط کشت، کلنی‌های فیبروبلاست شکل با پتانسیل تمایز هتروژن دارند که می‌توانند به سلول‌های استخوان، غضروف و چربی تمایز یابند (۱). از خصوصیات اصلی این سلول‌ها، خصوصیت خود تجدید شوندگی آن‌ها است. در واقع تکثیر یا خودتجدیدی، توانایی سلول‌ها در تولید کپی‌های یکسان از طریق تقسیم میتوز در یک دوره زمانی خاص است؛ به صورتی که خصوصیات ژنتیکی و کاریوتیپی در سلول‌های دختری درست شبیه سلول‌های مادر باقی می‌ماند. در حال حاضر MSCs روش معمولی برای سلول درمانی بسیاری از بی‌نظمی‌های تحلیل برنده، التهاب‌های مزمن و بیماری‌های خودایمنی و حتی رد پیوند است. فهمیدن مکانیسم‌ها و یا پتانسیل درمانی تعدیل کننده به واسطه MSC از هر دو جنبه فیزیولوژیک و کلینیک اهمیت دارد (۲).

به نظر می‌رسد که MSCها سیتوکین‌های پیش‌التهابی را که ممکن است پاسخ‌های ایمنی ذاتی را افزایش دهد، ترشح می‌کنند. بیشتر شواهد نشان می‌دهد که فعال شدن گیرنده‌های شبه تول (Toll-like receptors یا TLR) (یکی از اولین حسگرهای ایمنی ذاتی) تنظیم کننده این نوع پاسخ سیستم ایمنی است (۳). TLRها خانواده‌ای از پروتئین‌های غشاگذر نوع I هستند که ۱۲ نوع ($TLR_1$–$TLR_{12}$) از آن‌ها در پستانداران شناخته شده است. $TLR_2$ گیرنده زیموزان (زیموزان پلی‌ساکاریدی از دیواره مخمر Saccharomyces cerevisiae) است که به صورت هترودیمریک همراه با $TLR_6$ عمل می‌کند (۵، ۴).

آپوپتوز در سلول T فعال شده قسمتی از مکانیسم مهار ایمنی وابسته به سیتوکین التهابی MSCهای فعال شده است (۶). بنابراین جهت استفاده این سلول‌ها باید مکانیسم‌هایی که به دنبال آن‌ها مهار سیستم ایمنی رخ می‌دهد، تعیین گردد. یکی از مواد مهم، نیتریک اکسید می‌باشد. نیتریک اکسید یک بیومولکول گازی است که به سرعت از بین می‌رود و تکثیر سلول T فعال شده توسط TCR (T cell receptor) و تولید سیتوکین را در غلظت بالا مهار می‌کند (۸، ۷). نیتریک اکسید نقشی اساسی در عملکرد ماکروفاژها دارد و به تازگی مشخص شده است که بر سیگنالینگ TCR، بیان گیرنده سیتوکین‌ها و فنوتیپ سلول T اثر دارد (۹). هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر زیموزان به عنوان آگونیست $TLR_2$ با دو غلظت و زمان‌های مختلف بر روی پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی و مرگ القایی در سلول‌های T و در نهایت تعیین دوز و زمان مناسب تحریک آگونیست بر پاسخ سلول‌های بنیادی بود.

**روش بررسی**

**جداسازی سلول‌ها:** ۲۰ موش سوری با میانگین سنی ۸-۷ هفته و میانگین وزنی ۳۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری شد. حیوانات تا زمان انجام مراحل جداسازی مغز استخوان، در خانه حیوانات پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه نگهداری شدند و تمام مراحل انجام این پژوهش در Clean room (اتاق تمیز) پژوهشکده انجام گرفت. حیوانات با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار فلو به روش معمول اتر بیهوش شدند. برای به دست آوردن مغز استخوان از استخوان فمور و تیبیا، محیط کشت در حفره استخوان‌ها پیپتاژ (۱۰) و سپس سوسپانسیون سلولی جمع‌آوری شده مرحله قبل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفوژ شد.

**شمارش سلول‌ها:** جهت شمارش و تعیین زنده‌مانی سلول‌ها، ۰/۱ میلی‌لیتر رنگ تریپان آبی (Trypan blue) با ۰/۱

میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی مخلوط و با پیپت پاستور به روی لام نئولار منتقل شد. سلول‌هایی که رنگ آبی را نشان دادند، مورد شمارش قرار گرفتند. برای شمارش سلول‌ها از روش مقابل استفاده گردید که NC تعداد سلول‌های شمارش شده، D ضریب رقیق‌سازی و #Q تعداد مربع‌های شمارش شده می‌باشد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها به طور میانگین بیشتر از ۹۵ درصد بود.

$$NC \times D \times 10^4 \times \#Q$$

**کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال:** به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, USA)، ۱۰۶ × ۱ سلول به فلاسک T۲۵ (Jetbiofil, Germany) منتقل و همراه با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد (قبل از استفاده از FBS کمپلمان آن با قرار دادن در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد غیر فعال گردید). بعد از اتمام اولین انکوباسیون (بعد از ۲۴ ساعت)، مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌های غیر چسبنده همراه با مایع رویی از فلاسک خارج گردید و سلول‌های بنیادی مزانشیمال به کف فلاسک چسبیده باقی ماندند. تا رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ درصد، محیط کشت هر ۴-۳ روز یک بار تعویض شد (۱۰).

**تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیست TLR:** با رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ درصد و اعمال گروه شاهد، سلول‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. به این ترتیب که دو گروه با ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیموزان (Sigma-Aldrich, USA) و دو گروه دیگر با ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیموزان آگونیست $TLR_2$ مورد تیمار قرار گرفتند (۵، ۴). سپس سلول‌های تیمار شده همراه با گروه شاهد به مدت ۱ و ۱۲ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند (۱۱).

**جداسازی سلول‌های طحال موش:** سلول‌های T از طحال موش به دست آمد. بعد از ایجاد بیهوشی به روش معمول اتر تحت شرایط استریل، طحال جداسازی و در پلیت حاوی محیط DMEM قرار داده شد و به روش مکانیکی با استفاده از پیستون سرنگ استریل به طور کامل له گردید. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در این مرحله محلول فایکول به آرامی به مجموعه سوسپانسیون سلولی اضافه و با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سلول‌های تک هسته‌ای طحال که در حد فاصل محلول فایکول و سوسپانسیون سلولی واقع شده بودند، توسط پیپت پاستور به آرامی جمع‌آوری و به منظور حذف محلول فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای طحال با محیط کشت DMEM مخلوط و با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌های حاصل با محیط کشت DMEM مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند (۱۲).

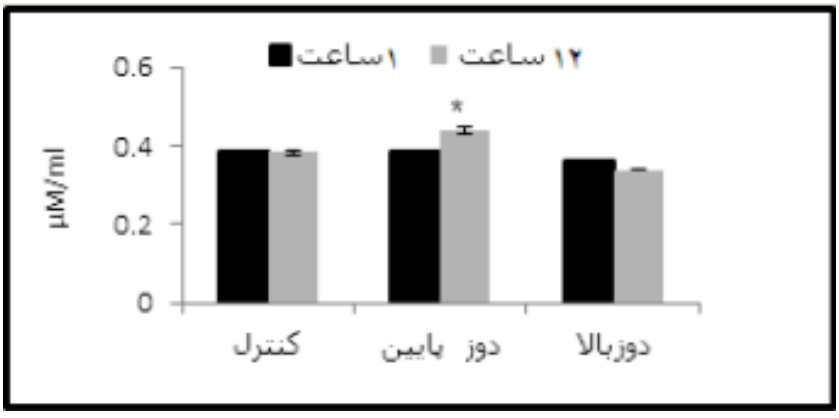
در نهایت تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای به دست آمده با استفاده از رنگ تریپان آبی و لام نئوبار تعیین شد. جهت تحریک سلول‌های T به ازای هر ۲ میلی‌لیتر محیط کشت، ۵۰ میکرولیتر PHA (Polyhydroxyalkanoate) (Gibco, UK) اضافه و سپس به مدت ۷۲ ساعت با سلول‌های مزانشیمال (که پیش‌تر با زیموزان تیمار شده بودند) مجاور شد.

**سنجش آپوپتوز به روش فلوسایتومتری:** فلوسایتومتری تکنولوژی است که در آن به طور همزمان چندین ویژگی فیزیکی یک ذره مثل سلول حین عبور جریان مایعی حاوی سلول‌ها از مقابل نور لیزر، اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل می‌گردد (۱۳). سلول‌های T موجود در مایع رویی سیستم هم‌کشت با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بعد از ۷۲ ساعت در لوله فالکون جمع‌آوری و با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۱۰۶ × ۱ سلول T به

داخل هر لوله فالکون منتقل و ۲ میکرولیتر Anti-CD۳ (eBioscience) به آن‌ها اضافه و ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر رنگ AO (Acridine orange) به آن‌ها اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با اضافه کردن رنگ PI (Propidium iodide)، میزان آپوپتوز سلول‌های T توسط دستگاه فلوسایتومتری [ساخت شرکت Partec (Germany) و نرم‌افزار MaxFlow] اندازه‌گیری گردید (۱۴).

**اندازه‌گیری نیتریک اکسید با آزمون Grease:** نیتریک اکسید ترکیبی بسیار ناپایدار است و به سرعت به نیتریت و نیترات تبدیل می‌شود. بنابراین غلظت نیتریت به عنوان شاخص تولید نیتریک اکسید در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ‌سنجی Grease به روش میکروپلیتی انجام می‌گیرد (۱۵). جهت اندازه‌گیری نیتریک اکسید از مایع رویی هر ۴ گروه مورد تیمار (گروه‌های تیمار شده با ۵ و ۲۵ میکروگرم زیموزان که هر کدام جداگانه به مدت ۱ و ۱۲ ساعت انکوبه شده بودند) و گروه شاهد استفاده شد. با توجه به ۳ تکرار در هر گروه، در مجموع ۳ چاهک به هر گروه تعلق داشت. آزمایش بدین ترتیب صورت گرفت که ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر گروه برداشته و به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از معرف Grease ۱ هم‌زمان به تمام چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از معرف Grease ۲ به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت (۱۵). بر این اساس، نیتریت موجود در چاهک‌ها در دمای اتاق به صورت طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدت‌های مختلف ظاهر گردید که در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه ELISA Reader خوانده شد. نمودار منحنی استاندارد با استفاده از جذب نوری غلظت‌های مشخصی از نیتریک اکسید در نرم‌افزار Excel رسم و سپس جذب نوری به دست آمده از چاهک‌های حاصل از گروه‌های مورد آزمایش در منحنی استاندارد قرار داده شد. در نهایت غلظت نیتریک اکسید بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق منحنی استاندارد محاسبه گردید (شکل ۱).

۵ سر موش به ازای هر گروه مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل شده به روش غیر پارامتریک و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردید. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون Tukey-HSD ( Tukey-Honest significant difference) و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد.



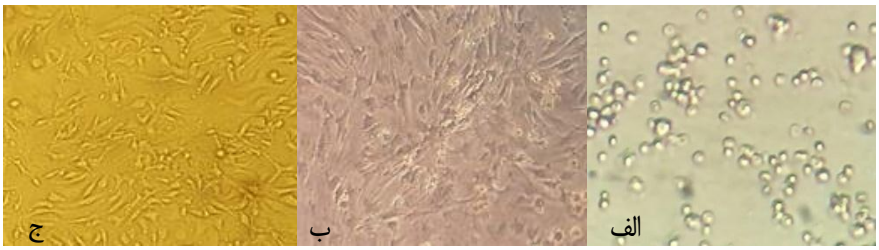

**شکل ۱.** *بررسی غلظت نیتریک اکسید تولید شده در مایع روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال*

*اختلاف معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵

## نتایج

### نتایج بررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال

فلاسک‌ها به صورت روزانه با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در روز اول جداسازی، سلول‌های مغز استخوان نیز همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت وجود داشت. سلول‌ها به طور میانگین بین ۱۴-۱۰ روز با رسیدن به تراکم ۷۰ درصد پاساژ داده شد و جمعیت به نسبت همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال با مورفولوژی سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست در پاساژ سوم کشت سلولی به دست آمد (شکل ۲).




**شکل ۲.** *روز اول کشت (الف)، روز هفتم کشت (ب) و سلول‌ها پس از پاساژ (ج)*

### نتایج حاصل از سنجش میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های T با رنگ‌آمیزی AO/PI روش فلوسایتومتری

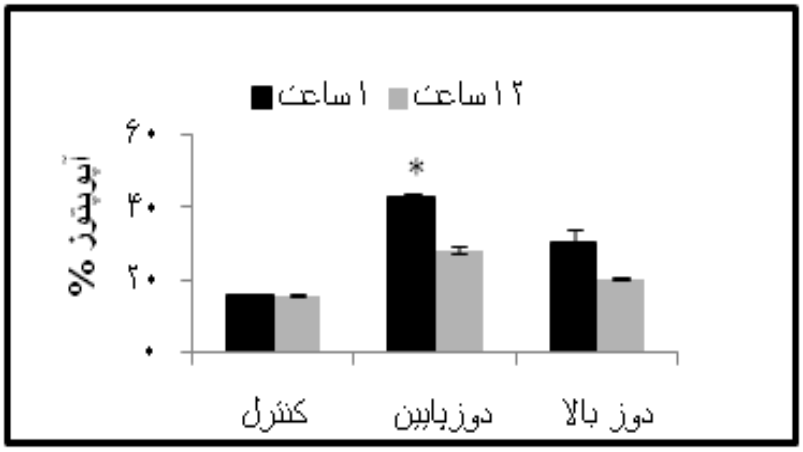
در این آزمایش درصد آپوپتوز سلولی تعیین گردید. به این ترتیب که در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی غشای سلول منتقل و AO به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا متصل می‌گردد و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. PI نیز به DNA (Deoxyribonucleic acid) قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده، توسط دستگاه فلوسایتومتری قابل تشخیص خواهد بود. در این‌جا سلول‌های رنگ شده با AO در مرحله آپوپتوز اولیه قرار دارند، سلول‌های رنگ شده با PI دچار نکروز شده‌اند، سلول‌هایی که با هر دو رنگ شده‌اند دچار آپوپتوز نهایی شده‌اند و گروه شاهد نیز توسط AO رنگ شد. سلول‌های MSC که با سلول T مجاور نشده بودند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند (جدول ۱).

**جدول ۱.** *تفکیک آپوپتوز و نکروز با استفاده از PI و AO*

| نوع سلولی | PI | AO |
|---|---|---|
| زنده | منفی | منفی |
| آپوپتوتیک اولیه | منفی | مثبت |
| آپوپتوتیک نهایی | مثبت | مثبت |
| نکروتیک | مثبت | منفی |

AO: Acridine orange; PI: Propidium iodide

نتایج به دست آمده از روش فلوسایتومتری نشان داد که بیشترین درصد آپوپتوز در سلول‌های T هم‌کشت شده با سلول‌های مزانشیمالی مشاهده شد که این سلول‌ها پیش‌تر با ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیموزان و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شده بودند و این میزان آپوپتوز مشاهده شده (۴۰ درصد) به صورت یک افزایش معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).




**شکل ۳.** *سنجش آپوپتوز سلول T در دو دوز ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیموزان در زمان ۱ و ۱۲ ساعت انکوباسیون*

بالاترین درصد آپوپتوز (۴۲/۶۵ درصد) در دوز ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۱ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه شاهد مشاهده شد

*اختلاف معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$

**نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکسید**

نتایج به دست آمده از آزمون Grease نشان داد که در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با دو دوز متفاوت زیموزان، بالاترین میزان نیتریک اکسید (۰/۴۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دوز پایین زیموزان (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد که به مدت ۱۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شده بود. بررسی‌های حاصل از آزمون Grease بیشترین نیتریک اکسید (۰/۴۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید شده را در مایه رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با دوز (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و مدت زمان ۱۲ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه شاهد نشان داد.

**بحث**

سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمعیتی از سلول‌ها هستند که در محیط آزمایشگاهی با چسبندگی به سطوح پلاستیکی به صورت کلنی‌های شبه فیبروبلاست تکثیر می‌یابند (۱) که در پژوهش حاضر از این ویژگی برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های جدا شده استفاده گردید. هرچند روش‌های دیگری از جمله استفاده از مارکرهای ویژه سطح سلولی نیز وجود دارد، اما به دلیل این‌که کار بر روی سلول‌های بنیادی در بخش ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به طور معمول انجام می‌شود و تا حال چندین بار توصیف مشخصات (Characterization) این سلول‌ها انجام شده و نتایج مشابهی ارایه داده است و همچنین صرف هزینه‌های بالا، از تکرار آن در این پژوهش خودداری شد. این سلول‌ها دارای پتانسیل فراوانی در زمینه سلول درمانی می‌باشند و به نظر می‌رسد بتوان پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها را با مداخله در گیرنده‌های زودرس بیان شده در سطح آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی تقویت کرد و از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های خودایمنی و التهابی استفاده کرد (۱۰).

TLRها یکی از گیرنده‌های ایمنی ذاتی هستند که در سطح تعداد وسیعی از سلول‌ها مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمال بیان شده‌اند و می‌توانند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت تأثیر قرار دهند (۱۴). تحقیقات نشان داده‌اند که نه تنها TLRهای مختلفی بر سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال بیان می‌شوند، بلکه متعاقب تحریک و

متعهد شدن آگونیست TLRها، این سلول‌ها قادر به مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهایی با تأثیرات قوی ایمونومدولاتوری هستند (۱۶).

به تازگی مشخص شده است که تحریک TLRهای ویژه در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌تواند پاسخ‌های ایمنی منتج از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش‌التهابی (MSC-۱) یا ضد التهابی (MSC-۲) جهت‌دهی کند. مطالعات پیشین تأثیر درگیری $TLR_۲$ را بر افزایش بقا و تکثیر سلول‌های MSC نشان داده است. همچنین مشخص شده است تحریک سلول‌های MSC با آگونیست‌های $TLR_۲$ به طور چشمگیری منجر به افزایش پتانسیل‌های ترمیمی این سلول‌ها در آسیب‌های میوکاردیت قلبی می‌شود که نشان دهنده تغییر و حرکت سلول‌های MSC به سمت فنوتیپ ضد التهابی می‌باشد (۱۷، ۱۴).

نتایج به دست آمده از تحریک $TLR_۲$ در سلول‌های MSC نشان داد که بر خلاف سیگنالینگ معمول سایر TLRها، سیگنالینگ هترودیمر برخی از لیگاندهای $TLR_۲$ مانند زیموزان می‌تواند منجر به شکل‌گیری فنوتیپ ضد التهابی در سلول‌های ایمنی شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سیگنالینگ ضد التهابی غیر معمول زیموزان تا حدود زیادی می‌تواند با به کارگیری هترودیمریک TLRهای دیگر مانند $TLR_۶$ و یا ساز و کارهای عمل کننده ناشناخته دیگر زیموزان در ارتباط باشد. تأثیر ایمونومدولاتوری MSCها وابسته به مهار تکثیر سلول‌های T توسط این سلول‌ها است (۱۸). پژوهش دیگری نشان داد که تکثیر سلول‌های T تحت تأثیر میتوژن‌های پلی‌کلونال، سلول‌های آلوژنیک و یا آنتی‌ژن‌های اختصاصی با وجود MSCها مهار می‌شود (۱۹). هرچند مطالعات فراوانی در رابطه با فعالیت مهاری سیستم ایمنی MSCها صورت گرفته است، اما هنوز این مکانیسم‌ها به صورت جزیی شناخته نشده‌اند. در این بین، مکانیسم‌های وابسته به تماس سلولی و یا ترشح فاکتورهای محلول برای شرکت در القای مهار ایمنی وابسته به MSCها قابل تأمل هستند (۲۰).

فاکتورهای مهاری محلول مختلفی برای تنظیم ایمنی وابسته به MSCها در نظر گرفته شده است که یا توسط MSCها به طور مداوم تولید و یا در نتیجه برخورد و مواجهه با سلول‌های هدف آزاد می‌شوند. یک نمونه از این مولکول‌ها، نیتریک اکسید است که توسط MSCها تنها بعد از تولید IFN-γ (Interferon) به وسیله سلول هدف آزاد می‌شود. نیتریک اکسید ذخایر تریپتوفان (که یک اسید آمینه ضروری برای تکثیر سلول T است) را تجزیه می‌کند (۲۱).

IFN-γ به تنهایی و یا با ترکیب با سیتوکین‌های پیش‌التهابی [TNF، IL-1α,ß (Interleukin 1α,β)] تولید کموکاین‌ها توسط MSCها را تحریک می‌کند که از این طریق سلول‌های T جذب و باعث القای نیتریک اکسید سنتتاز می‌شود و با تولید نیتریک اکسید، سلول T مهار می‌گردد (۲۲). بنابراین ممکن است که مولکول‌های همراه پاتوژن، اثرات مهاری MSCها را روی سلول T معکوس و پاسخ‌های مؤثر سلول T را در برابر پاتوژن تقویت کنند (۲۰، ۶).

گزارش‌ها در رابطه با مهار سیستم ایمنی توسط MSCها نتایج مختلفی را به دنبال داشت (۲۲) که ممکن است بخشی از این اختلافات بر پایه روش‌های مختلف کشت به کار برده شده باشد. همچنین بسیاری از گزارش‌ها بر پایه تأثیر بر تکثیر سلول T القا شده توسط فعال شدن و یا تولید سیتوکین است (۲۳). به همین دلیل بخشی از آزمایش‌ها، تأثیر مستقیم MSCها را بر روی تکثیر سلول T بررسی کرده‌اند (۱۷،۲۳). در طی این آزمایش‌ها سلول‌های T قادر به تولید سیتوکین نبودند، مگر این‌که از طریق TCR تحریک می‌شدند. وقتی که سلول‌های T همراه با MSCها کشت داده می‌شود، تکثیر ناشی از IL-۲ به طور

شگفت‌انگیزی توسط MSCها بی‌نتیجه بود. بنابراین در عدم وجود سیتوکین‌های سلول T، MSCها قادر به مهار تکثیر سلول‌های T نبودند. در سیستم هم‌کشت MSCها با سلول T در صورت فعال بودن سلول T، پاسخ این سلول مهار می‌شد و توجیه کننده این نکته است که سیتوکین‌های ترشح شده از این سلول می‌توانند در این فرایند نقش داشته باشند. در نهایت نتایج به دست آمده نشان داد که IFN-γ نقش کلیدی را در این فرایند ایفا می‌کند (۲۳).

گروهی از مطالعات گزارش کرده‌اند که توانایی مهار ایمنی ناشی از MSCها ذاتی نیست، بلکه توسط سیتوکین‌های پیش‌التهابی القا می‌شود. این سیتوکین‌ها به طور قوی نیتریک اکسید سنتتاز و چندین کموکاین قوی لکوسیتی را القا می‌کنند که ممکن است سلول‌های ایمنی شامل APC (Antigen-presenting cell)، B و T تا حدودی نزدیک به مجاورت MSCها آورده شوند؛ جایی که سطح بالای نیتریک اکسید تولید شده می‌تواند عملکرد این سلول‌ها را مهار کند. بنابراین غلظت فعال کموکاین و نیتریک اکسید فعال شده با سیتوکین نقش کلیدی در مهار سیستم ایمنی توسط MSCها ایفا می‌کند. همچنین آپوپتوز به نیتریک اکسید وابسته است؛ چرا که وقتی نیتریک اکسید سنتتاز مهار شده بود، آپوپتوز سلول T مشاهده نشد. بنابراین نیتریک اکسید دوره استراحت سلولی را القا می‌کند (۲۴-۲۳).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت پروآپوپتیک سلول‌های MSC تیمار شده با زیموزان در مواجهه با لنفوسیت‌های T در دوز حداقل، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد داشت. به نظر می‌رسد ساز و کار این تأثیر تا حد زیادی می‌تواند در نتیجه مشابهت با شیب غلظتی باشد که مولکول‌های حاصل از آسیب بافتی در مراحل پایانی التهاب در ریز محیط آسیب دارند و می‌توانند منجر به شکل‌گیری پاسخ‌های ضد التهابی با آغاز روند ترمیم بافتی گردند. این نتایج می‌تواند در توافق با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی حاکی از تأثیرات متفاوت برنامه‌های تحریک سلول با پروتکل‌های دوز و زمان مختلف آگونیست‌های TLR در سلول‌های بنیادی مزانشیمال باشد (۸،۲۳).

علاوه بر این، به دلیل طبیعت هترودیمریک گیرنده‌های مربوط به آگونیست زیموزان، احتمال پیام‌رسانی التهابی یا ضد التهابی متفاوت آن‌ها با آگونیست‌های مونومریک وجود دارد. با توجه به تیمار انجام گرفته بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روند افزایش القای آپوپتوز در سلول‌های T، همبستگی معنی‌داری را با تغییرات غلظت نیتریک اکسید ترشح شده از این سلول‌ها نشان نمی‌دهد. بنابراین تصور نمی‌شود که این سلول‌ها مکانیسم‌های مستقل از نیتریک اکسید را در القای آپوپتوز سلول‌های T به کار گیرند. در نهایت چنین می‌توان نتیجه گرفت که تحریک TLRهای سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش با دوز مناسب آن آگونیست و مدت تماس آن با سلول مزانشیمال در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند سلول مزانشیمال را به سمت فنوتیپ ضد التهابی و سرکوبگر سلول‌های T خودواکنشگر که عامل بیماری‌های التهابی و خودایمنی هستند، سوق دهد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقایان علیاری و ثانی کارشناسان محترم بخش ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و کارکنان پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه و همچنین تمام دوستان به ویژه سرکار خانم انسیه زحمتکش که در انجام این پروژه همکاری داشتند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## References


1. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9): 726-36.
2. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 313-9.
3. Hwa CH, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 2006; 24(12): 2744-52.
4. Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso N, So A. $TLR_2$ modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(2): R370-R379.
5. Mullaly SC, Kubes P. Mast cell-expressed complement receptor, not $TLR_2$, is the main detector of zymosan in peritonitis. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 224-34.
6. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(5): 34.
7. Hoffman RA, Mahidhara RS, Wolf-Johnston AS, Lu L, Thomson AW, Simmons RL. Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation* 2002; 74(6): 836-45.
8. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of Adult Mesenchymal Stem Cells Activity by Toll-Like Receptors: Implications on Therapeutic Potential. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010: 9.
9. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(Suppl) 3: iii37-iii40.
10. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 2007; 51(8): 723-9.
11. Camargo Bittencourt RA, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Ehrhardt de Oliveira AP, Deffune E. isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortop Bras* 2006; 14(1): 22-4.
12. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007; 109(4): 1422-32.
13. Abarbanell AM, Wang Y, Herrmann JL, Weil BR, Poynter JA, Manukyan MC, et al. Toll-like receptor 2 mediates mesenchymal stem cell-associated myocardial recovery and VEGF production following acute ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(5): H1529-H1536.
14. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le BK. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76(8): 1208-13.
15. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. *Cell Immunol* 2009; 257(1-2): 23-31.
16. Ghasemi A, Hedayati M, Beiabani H, Khoshbaten A, Asgari AR. Deproteinized methods of measuring serum nitric oxide

graisemetho. *Pajouhesh Dar Pezeshki* 2007; 31(1): 33-8. [In Persian].

17. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 2008; 26(1): 279-89.
18. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; 217(2): 318-24.
19. Samon JB, Champhekar A, Minter LM, Telfer JC, Miele L, Fauq A, et al. Notch1 and TGFβ1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* 2008; 112(5): 1813-21.
20. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 2010; 316(14): 2213-9.
21. Ryan JM, Barry F, Mahon BP, Murphy JM. Interferon-? does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 149(2): 353-63.
22. Lombardo E, DelaRosa O, Mancheno-Corvo P, Menta R, Ramirez C, Buscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(7): 1579-89.
23. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 141-50.
24. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunology and Cell Biology* 2006; 84: 413-22.

# Nitric Oxide Production and Apoptosis Induction in T Cells through Stimulation of Mesenchymal Stem Cells with Zymosan

**Elham darabi, M.Sc.[1*], Ahmad Morshedi, Ph.D.[2], Amir Tokmechi, Ph.D.[3], Norooz Delirezh, Ph.D.[4]**

1. Master of Microbiology, School of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, School of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor, Artemia Research Center, Urmia University, Urmia, Iran
4. Assistant Professor, School of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

* Corresponding author; e-mail: elidarabi@ymail.com

(Received: 1 July 2013 Accepted: 1 July 2014)

## Abstract

**Background & Aims:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-hematopoietic multipotant cells, which multiply through attaching to culture plates. Toll-like receptors (TLRs) are inherent immune sensors and regulators of immunomodulatory activities of MSCs. The aim of this study was to investigate the effects of zymosan on stem cell polarization into anti-inflammatory phenotypes through the production of nitric oxide and apoptosis induction in activated T cells.

**Methods:** In this study, MSCs were isolated from mice femur and tibia bone marrow and incubated for 24 hours. Isolation of MSCs with a tendency to stick to the flask was performed during the renewing of the medium. MSCs were grown to 70 percentage of confluence in the medium, and then, they were stimulated with $TLR_2$ agonist (5 and 25 µg/ml doses) and incubated with 5% carbon dioxide for 1 and 12 hours in 37 $^oC$. Supernatant medium was collected to measure nitric oxide production using Graise test. Percentage of apoptosis in activated T cells was measured using anti-CD3PE, acridin orange/propidium iodide (PI/AO) staining and flow cytometry.

**Results:** We found that the rate of apoptosis in activated T cells increased significantly in cells incubated with a 5 µg/ml dose of zymosan for 1 hour in comparison with the control group ($P < 0.05$). Moreover, a significant increase was observed in nitric oxide production of cells treated with the same dose for 12 hours ($P < 0.05$).

**Conclusion:** Based on these results, we can conclude that different doses, TLR agonist type, and duration of incubation impact nitric oxide production and apoptosis rate in activated T cells.

**Keywords:** Apoptosis, Mesenchymal stem cell (MSC), Nitric oxide, Zymosan

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(3): 218-228