

## تأثیر پیتید و گلیکان-لیپوپلی ساکارید بر میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش (MSC) و القا آپوتوز در سلول‌های T فعال شده توسط این سلول‌ها

الهام دارابی<sup>۱\*</sup>، احمد مرشدی<sup>۲</sup>، نوروز دلیرز<sup>۳</sup>، امیر توکمه‌چی<sup>۴</sup>، آرام مکاری‌زاده<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت 1392/06/02 تاریخ پذیرش 1392/09/14

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** سلول‌های بنیادی مزانشیمال، سلول‌های بالغی هستند که به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز و چند توانی معرفی می‌شوند. تحریک ویژه گیرنده‌ای شبه تول در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌تواند پاسخ‌های ایمنی ناشی از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی یا ضد التهابی جهت دهی کنند. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر پیتید و گلیکان-لیپوپلی ساکارید بر روی پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی و القا آپوتوز در سلول‌های T.

**مواد و روش کار:** از استخوان فمور و تیسیا سوسپانسیون سلولی تهیه و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تمایل به چسبیدن به فلاسک صورت گرفت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰٪، با آگونیست TLR در دو دوز بالا (۱۰ نانوگرم/میلی لیتر) و پایین (۵ نانوگرم/میلی لیتر) و به مدت ۱۲ و ۱۲۰ ساعت تیمار شدند. سپس مایع رویی سلول‌ها جهت اندازه گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری شد. درصد آپوتوز در سلول‌های T به روش فلو سایتومتری و رنگ آمیزی آکریدین - اورنج / پروپیوم آیداید (AO/PI) اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** MSCها که در دوز پایین (۵ نانوگرم/میلی لیتر) و ۱۲ ساعت انکوباسیون با آگونیست TLR4 تیمار شده بودند افزایش معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) در آپوتوز القا شده در سلول‌های T در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. همچنین یافته‌ها افزایش معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) در میزان تولید نیتریک اکساید در دوز بالا (۱۰ نانوگرم/میلی لیتر) و ۱۲۰ ساعت انکوباسیون MSCهای تیمار شده با آگونیست TLR4 نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

**بحث و نتیجه گیری:** از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت دوز آگونیست و مدت زمان تیمار سلول‌های بنیادی با آن می‌تواند تأثیرات مختلفی در فعالیت آپوتوزی MSCها و تولید نیتریک اکساید داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** آگونیست TLR، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، آپوتوز، نیتریک اکساید

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوازدهم، ص ۹۹۶-۱۰۰۴، اسفند ۱۳۹۲

آدرس مکانبه: بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه - ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۹۳۷۱۹۹۰۲۴۴

Email: elidarabi@gmail.com

### مقدمه

بلوغ و مهاجرت سلول‌های بنیادی خون ساز به جریان خون شرکت دارند (۲). اهمیت این سلول‌ها به دلیل سهولت نسبی در جدا سازی و همچنین تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند که ویژگی‌های خاص یک بافت را نشان نمی‌دهند اما تحت تأثیر سیگنال‌های مناسب می‌توانند به سلول‌های تخصصی با فنوتیپ متفاوت از سلول ابتدایی تمایز یابند (۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمعیت کمی از سلول‌های بنیادی بالغ غیر خون ساز توصیف می‌شوند، که از بافت‌های همبند تقریباً تمام ارگان‌ها از جمله عضله، استخوان، غضروف و غیره جدا شده‌اند (۱). این سلول‌ها نماینده بخش بسیار کوچکی از سلول‌های هسته دار در مغز استخوان هستند که در تنظیم

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> دانشیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۳</sup> استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۴</sup> استادیار، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آبریان آرتیمیا دانشگاه ارومیه

<sup>۵</sup> دانشجوی دکتری، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های خود ایمن که عامل اغلب آن‌ها سلول T است در آینده امیدوار بود. نظر به اینکه آگونیست‌هایی نظیر پپتید و گلیکان-لیپوپلی‌ساکارید<sup>۴</sup> می‌توانند سلول‌های بنیادی مزانشیمال را به سمت فنوتیپ ضد التهابی که ترشح سایتوکاین‌های ایمنونو ساپرسیو نظیر PGE2,IDO,NO,TGF- $\beta$  را موجب می‌شوند، بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر (PGN-LPS) به عنوان آگونیست TLR با دو غلظت و زمان‌های مختلف بر روی پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی و آپوپتوز القا می‌شود در سلول‌های T و نهایتاً تعیین دوز و زمان مناسب تحریک آگونیست بر پاسخ سلول‌های بنیادی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال

۴۰ سر موش سوری با میانگین سنی ۷ تا ۸ هفته با میانگین وزنی ۳۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری شدند. حیوانات به روش قطع نخاعی بیهوش شدند. از دو استخوان فمور و تیبیا مغز استخوان به دست آمد (۱۲). سوسپانسیون سلولی به دست آمده با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. تعداد  $1 \times 10^6$  سلول به ازای هر میلی لیتر در محیط کشت DMEM<sup>۵</sup> (-Sigma-Aldrich - آمریکا) همراه با ده درصد FBS<sup>۶</sup> (Gibco انگلستان) تهیه شد و به فلاسک T25 (Jetbiofil - آلمان) منتقل و در دمای ۳۷ درجه با ۵ درصد CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از گذشت مدت زمان اولین (۲۴ ساعت) انکوباسیون مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های غیر چسبیده همراه با مایع رویی از فلاسک خارج شدند و سلول‌های بنیادی مزانشیمال به کف فلاسک چسبیده باقی ماندند. تا رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ درصد تعویض محیط کشت هر ۳ تا ۴ روز یک بار انجام گرفت.

#### تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیست TLR.

با رسیدن سلول‌ها به تراکم و بارآمدگی ۷۰ درصد، با اعمال گروه کنترل سلول‌ها به دو گروه تقسیم شده و از هر گروه سه تکرار انتخاب شد. یک گروه با دوز پایین (۵ نانوگرم/میلی لیتر) و گروه دیگر با دوز بالا (۱۰ نانوگرم/میلی لیتر) (PGN-LPS) (آگونیست TLR) تهیه شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرتیمیا تیمار و هر سه گروه به مدت ۱ و ۱۲ ساعت در

مطالعات متعدد حاکی از این است که سلول‌های بنیادی مزانشیمال سطح فعالی از فاکتورهای محلول (سایتوکاین و فاکتور رشد) را ترشح می‌کنند که قادرند به صورت پاراکرین بسیاری از فرایندهای همراه با بیماری‌های مختلف از جمله فعال کردن سلول‌های پیش‌ساز بنیادی موجود در بافت‌ها، آپوپتو، تحریک رگ زایی و مهار التهاب را تنظیم کنند (۴). در واقع این سلول‌های موجود در ارگان‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی، به عنوان منبعی از سلول‌ها برای جایگزینی و تولید مجدد در طول تغییر و تبدیل طبیعی سلول و تعمیر بافت‌های آسیب دیده و یا در پاسخ به عوامل بیولوژیکی عمل می‌کنند (۵). مطالعات فراوان حاکی از این است که TLR<sup>۱</sup>ها به عنوان یکی از ایمنونوسورها می‌توانند سبب تنظیم فعالیت سلول‌های بنیادی مزانشیمال گردند (۶). TLRها گیرنده‌هایی هستند که الگوهای مولکولی همراه پاتوژن را شناسایی می‌کنند و فعال شدن سلول‌های ایمنی را ارتقا می‌بخشند. آگونیست‌های TLR شامل میکروب‌های خارج سلولی (مانند ترکیبات دیواره باکتری) و مولکول‌های داخل سلولی (مانند پروتئین شوک حرارتی) و ماتریکس داخل سلولی (مانند فیبرونکتین) است (۷). اکثر مطالعات روی این نکته تاکید دارند که بین تحریک TLR ویژه و پاسخ‌های ایمنومدولیاتیوری ناشی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال ارتباط وجود دارد. بنابراین با بررسی نقش سیگنالینگ منظم TLRها در بیولوژی این سلول‌ها، و دلالت این نقش بر ظرفیت ایمنونویستی و مهار ایمنی وابسته به این سلول‌ها، می‌توان از آن‌ها در سلول درمانی برای درمان نواقص ناشی از بیماری‌های التهابی استفاده کرد (۸). یکی از جنبه‌های اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مهار فعالیت و تکثیر سلول‌های ایمنی است (۹). مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد توانایی تنظیم پاسخ‌های ایمنی وابسته به تماس سلول به سلول و ترشح فاکتورهای محلول (IDO<sup>۲</sup>, NO, TGF- $\beta$ <sup>۳</sup>) توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال در پاسخ به سایتوکاین‌های ترشح شده به وسیله سلول‌های ایمنی فعال شده است (۱۰). هرچند مکانیسم‌های مهار ایمنی توسط این سلول‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است، اما یکی از کاندیدهای برجسته نیتریک اکساید است. نیتریک اکساید و گونه‌های فعال نیتروژن مشتق از آن می‌توانند با بسیاری از آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و گیرنده‌های سلولی از جمله گیرنده سلول T واکنش دهند (۱۱). با یافتن مکانیسم‌هایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمال فعالیت و عملکرد سلول‌های ایمنی را مهار می‌کنند می‌توان به کاربرد بهتر این

<sup>۴</sup> Peptidoglycan-lipopolysaccharid

<sup>۵</sup> Dulbeccos Modified Eagle Medium

<sup>۶</sup> Fetal bovin serum

<sup>۱</sup> Toll like receptor

<sup>۲</sup> Indoleamine 2,3 dioxygenase

<sup>۳</sup> Transforming Growth Factor- $\beta$

سلول‌های بنیادی مزانشیمال به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از معرف گریس ۱ همزمان به تمام چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. بلافاصله ۲۰ میکرولیتر از معرف گریس ۲ به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. بر این اساس نیتريت موجود در چاهک‌ها در دمای اتاق به صورت طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدت‌های مختلف ظاهر شد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده غلظت نیتریک اکساید بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

آنالیز داده‌ها:

در این مطالعه به منظور مقایسه میانگین داده‌ها در هر گروه با گروه کنترل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey-HSD استفاده شد.

### یافته‌ها

نتایج بررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال:

به طور روزانه فلاسک‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. در روز اول جداسازی دیگر سلول‌های مغز استخوان نیز همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت حضور داشتند. سلول‌ها بعد از این که به طور میانگین بین ۱۴-۱۰ روز با رسیدن به تراکم ۷۰ درصد پاساژ داده شدند. جمعیت نسبتاً همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال با مورفولوژی سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست در پاساژ سوم کشت سلولی به دست آمد. (تصویر ۱).

۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد  $CO_2$  انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون (۱۲ ساعت) مایع روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جهت اندازه‌گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری شد و سلول‌ها با محیط کشت تازه شست‌وشو داده شدند.

مجاور سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با سلول‌های T.

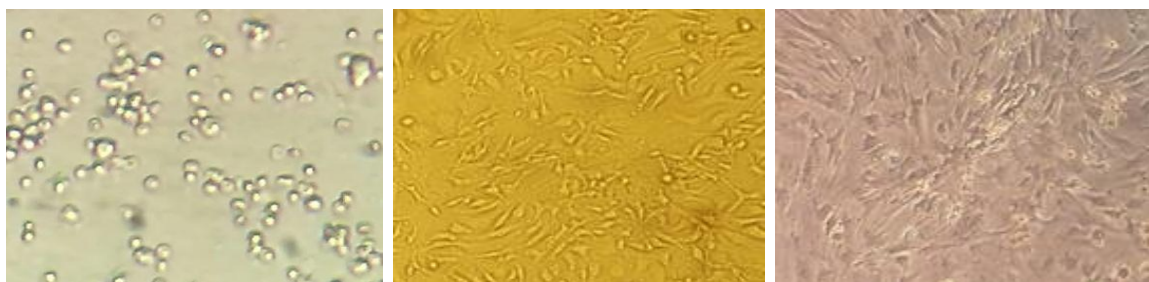
به منظور تعیین درصد آپوپتوز القایی در سلول‌های T توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال، سلول‌های T از طحال موش جداسازی شد و بعد از تحریک با PHA (Gibco-انگلستان) به مدت ۷۲ ساعت با سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با آگونیست TLR مجاور شدند.

سنجش آپوپتوز با فلوسایتومتری:

بعد از ۷۲ ساعت سلول‌های T موجود در مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ شدند. تعداد  $1 \times 10^6$  سلول T به داخل هر لوله فالکون منتقل شد و ۲ میکرولیتر Anti-CD<sub>3</sub> به آن‌ها اضافه شد و ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر رنگ آکریدین-اورنج به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با اضافه کردن PI توسط دستگاه فلوسایتومتری میزان آپوپتوز سلول‌های T اندازه‌گیری شد (۱۲).

اندازه‌گیری نیتریک اکساید با تست گریس:

نیتریک اکساید ترکیبی بسیار ناپایدار است و به سرعت به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا غلظت نیتريت به عنوان شاخص تولید نیتریک اکساید در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ سنجی گریس به روش میکرو پلیتی انجام پذیرفت (۱۳). به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی



a

b

c

تصویر ۱. a. روز اول کشت، b. روز هفت کشت، c. سلول‌ها بعد از پاساژ

بودند به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

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

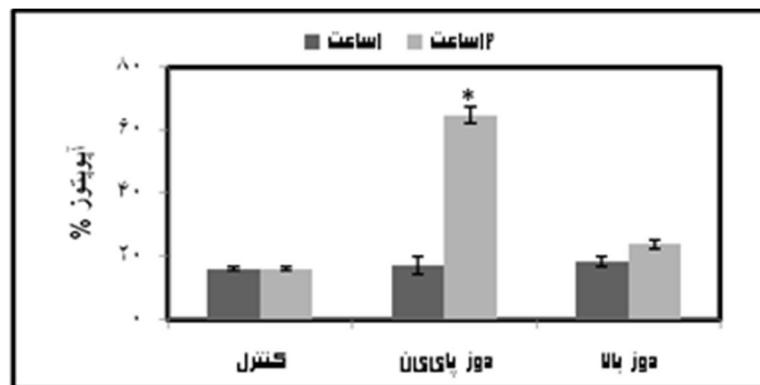
نوع سلولی	AO	PI
زنده	منفی	منفی
آپوپتوتیک اولیه	مثبت	منفی
آپوپتوتیک نهایی	مثبت	مثبت
نکروتیک	منفی	مثبت

با سنجش درصد آپوپتوز به کمک روش فلوسایتمتری، یافته‌ها افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در آپوپتوز سلول‌های T مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با پپتید و گلیکان - لیپوپلی ساکارید در دوز پایین ( $5 \text{ ng/ml}$ ) و مدت زمان ۱۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند.

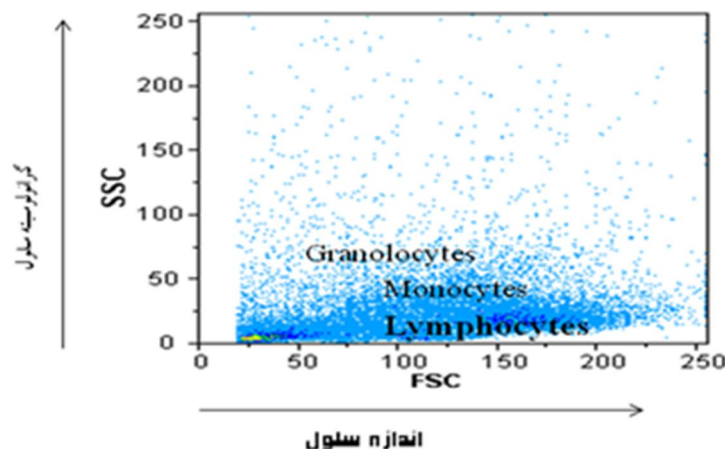
نتایج حاصل از سنجش میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های T به روش رنگ آمیزی Acridin- orange/PI روش فلوسایتمتری:

در این آزمایش درصد آپوپتوز سلولی تعیین گردید. به این ترتیب که در طی آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی غشا سلول منتقل شده و Acridin- orange به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتمتری تشخیص داده می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتمتری قابل تشخیص خواهد بود.

در این جا سلول‌های رنگ شده با Acridin-orange در مرحله Early apoptosis قرار دارند و سلول‌های رنگ شده با PI دچار نکروز شده‌اند و سلول‌هایی که با هر دو رنگ شده‌اند دچار Late apoptosis شده‌اند. گروه کنترل هم توسط Acridin- orange رنگ شدند. سلول‌های MSC که با سلول T مجاور نشده

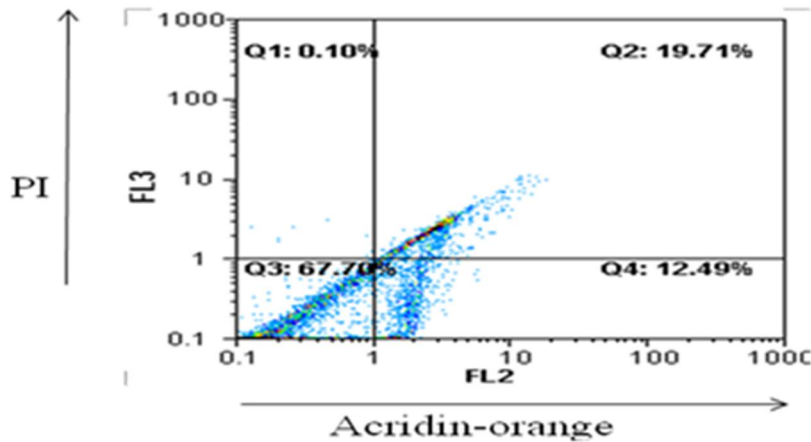


**نمودار الف:** سنجش آپوپتوز سلول T در دوزهای بالا ( $10 \text{ ng/ml}$ ) و پایین ( $5 \text{ ng/ml}$ ) پپتید و گلیکان - لیپوپلی ساکارید در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون که بالاترین درصد آپوپتوز ( $67.79\%$ ) در دوز ۵ نانوگرم/میلی لیتر و در ۱۲ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p \leq 0.05$  می‌باشد.



**شکل (۱):** الگوی هیستوگرام فلوسایتمتری جهت بررسی سلول‌های T. محور عمودی (SSC) گرانولوسیت سلول و محور افقی (FSC) اندازه

سلول را نشان می‌دهد.

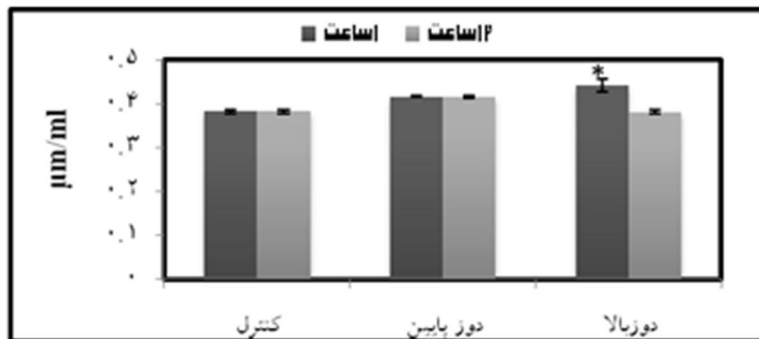


شکل (۲): نمودار نقطه‌ای حاصل از بررسی آپوپتوز القا شده در سلول‌های T توسط MSCs. محور عمودی (PI) و محور افقی (AO). Q<sub>1</sub>: آپوپتوز اولیه، Q<sub>2</sub>: آپوپتوز تأخیری، Q<sub>3</sub>: سلول‌های زنده، Q<sub>4</sub>: سلول‌های نکروتیک

پپتید و گلیکان-لیپو پلی ساکارید بالاترین میزان نیتریک اکساید (۰/۴۱۴ μm/ml) در دوز بالا (۱۰ ng/ml) و در مدت زمان یک ساعت مشاهده گردید.

نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید:

نتایج به دست آمده از تست گریس حاکی از آن بود که در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با دوز بالا و پایین



نمودار (ب): بررسی غلظت نیتریک اکساید تولید شده در مایع روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال. بررسی‌های حاصل از تست گریس بیشترین نیتریک اکساید (۰/۴۱۴ μm/ml) تولید شده را در مایه رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با دوز (۱۰ ng/ml) و مدت زمان ۱ ساعت انکوباسون نسبت به گروه کنترل نشان داد. \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p \leq 0.05$  می‌باشد

است تبدیل نموده است. از این رو به نظری رسد که تقویت پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها با مداخله در سنسورهای زودرس بیان شده در سطح این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بتواند کاربرد درمانی تقویت شده‌ای را برای این سلول‌ها در درمان بیماری‌های خود ایمن و التهابی به همراه داشته باشد (۱۴). TLRها یکی از گیرنده‌های ایمنی بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد که می‌تواند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت الشعاع قرار دهند.

## بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز و چند توانی معرفی می‌شوند که در طیف وسیعی از بافت‌های بالغ بدن یافت می‌شوند. ویژگی شاخص این سلول‌ها سهولت نسبی جداسازی و تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد که در کنار پتانسیل سرکوب ایمنی و تمایزی کارآمد، این سلول‌ها را به ابزاری بالقوه در برنامه درمانی بیماری‌های خودایمن که طی آن پاسخ‌های التهابی خود واکنشگر سبب اصلی آسیب‌های بافتی

آگونیست TLR4 در دوزهای پایین و کوتاه مدت در جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ پیش التهابی مؤثر می‌باشد (۶). مطالعات قبلی درگیری گیرنده TLR2 را بر افزایش بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال داده‌اند با این حال Pevsener-Fischer و همکاران نشان دادند که درگیری این گیرنده‌ها تأثیری بر پتانسیل‌های ضدالتهابی سلول‌های MSC ندارد (۱۹). هرچند Abarbanell و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده‌اند که تحریک این سلول‌ها با آگونیست‌های TLR2 به طور چشمگیری می‌تواند منجر به افزایش توانایی‌های ترمیمی این سلول‌ها در آسیب‌های میوکاردیت قلبی شود که نشان دهنده جهت‌گیری پاسخ‌های بنیادی مزانشیمال به سمت فنوتیپ ضدالتهابی می‌باشد (۲۰). همچنین مطالعات انجام گرفته تأثیرات سلول‌های مزانشیمال را بر مهار واکنش مختلط لنفوسیت بررسی کردند که در نهایت پی بردند که سلول‌های مزانشیمال MLR را نیز با واسطه نیتریک اکساید و سایتوکاین‌های التهابی مهار می‌کنند (۱۲). که این نتایج قویاً بیانگر این هستند که تولید نیتریک اکساید به‌وسیله سایتوکاین‌های القایی توسط سلول‌های مزانشیمال واسطه مهار تکثیر سلول‌های T هستند در تلاش برای حل این تناقض‌ها یا همراهی با نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر اقدام به تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیست‌های TLR4 در برنامه‌های زمانی و دوز متفاوت گردید. در این پژوهش به دلیل شباهت بیشتر با ساختار باکتری از پپتد و گلیکان-لیپوپلی ساکارید به صورت هم زمان استفاده شد. در ادامه تغییرات فعالیت آپوپتوتیک سلول‌ها در مواجهه با لنفوسیت‌های T فعال شده به عنوان شاخصی از تغییر جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی یا ضدالتهابی مورد توجه قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت پروآپوپتوتیک MSCs در مواجهه با لنفوسیت‌های T در گروه تیمار شده با پپتید و گلیکان-لیپوپلی ساکارید در دوز حداقل افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در واقع با تحریک TLR4 MSCs اقدام به ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌کنند. به نظر می‌رسد که سازوکار این تأثیر تا حد زیادی می‌تواند در نتیجه مشابهت با شیب غلظتی باشد که مولکول‌های حاصل از آسیب بافتی در مراحل پایانی روند التهاب در ریز محیط آسیب دارند و می‌توانند منجر به شکل‌گیری پاسخ‌های ضدالتهابی با آغاز روند ترمیم بافتی گردند. این نتایج می‌تواند در توافق با نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی باشد که تأثیرات متفاوت برنامه‌های تحریک سازی سلول با پروتکل‌های دوز و زمان مختلف آگونیست‌های TLR در سلول‌های بنیادی مزانشیمال نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در تیمارهای انجام پذیرفته بر روی

Tomchuck و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که نه تنها TLRهای مختلفی بر سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال بیان می‌شوند بلکه متعاقب تحریک و متعهد شدن آگونیست‌های TLRها، این سلول‌ها قادر به مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهای با تأثیرات قوی ایمنو مدیولاتوری هستند (۱۵). اخیراً مشخص شده است تحریک TLRهای ویژه در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌تواند پاسخ‌های ایمنی منتج از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی (MSC-1) یا ضدالتهابی (MSC-2) جهت دهی کند. بر این اساس فنوتیپ پیش التهابی یک نوع پاسخ زودرس سلول به آسیب‌های بافتی بوده و پیش برنده مقطعی یا گذرای روند التهاب به وقوع پیوسته می‌باشند. در مقابل فنوتیپ ضدالتهابی نقشی مشابه مونوسیت‌ها در روند التیام و ترمیم جراحات و آسیب‌های بافتی دارند. یکی از توانمندی‌های فنوتیپ ضد التهابی افزایش تولید NO یا IDO و تقویت توانایی القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده می‌باشد (۱۶). نیتریک اکساید تولید شده به سرعت از منبع تولیدی خود منتشر می‌شود اما غلظت فعال آن به سرعت تا حدود  $100 \mu\text{m/ml}$  کاهش می‌یابد، بنابراین نیتریک اکساید می‌تواند تنها در مجاورت سلول‌های تولید کننده آن فعالیت و تأثیر خود را اعمال کند (۱۲). هرچند عملکرد ترمیم و ضدالتهابی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در حال استراحت طی مطالعات متعدد مورد تأیید قرار گرفته، به نظر می‌رسد که این توانایی در صورت جهت‌گیری این سلول‌ها به سمت فنوتیپ ضدالتهابی پاسخ‌های سرکوب کننده ایمنی تقویت شده‌ای را به دنبال داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که از میان TLRهای مختلف بیان شده به‌وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمال، TLRهای ۲،۳،۴ بیشترین تأثیر را بر جهت‌گیری پاسخ این سلول‌ها به سمت فنوتیپ‌های یاد شده داشته باشند (۱۷). نخستین بار Mourez و همکاران نشان دادند که تحریک گیرنده‌های TLR3 و TLR4 در سلول‌های مزانشیمال موشی منجر به افزایش تولید واسطه‌های پیش التهابی IL-1، IL-6، IL-8، CCL5 می‌شود (۱۸). همچنین طی مطالعه‌ای موازی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی نتایج مشابهی به دست آمد. مطالعات بعدی نشان داد که علاوه بر نوع TLR درگیر، دوز آگونیست TLR بکار رفته و مدت زمان تحریک سلول‌ها با آگونیست مزبور می‌تواند در جهت‌گیری سلول به سمت یکی از دوفنوتیپ پیش‌التهابی و ضد التهابی مؤثر باشد. برخلاف نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی Bunell و همکاران در سال ۲۰۱۰، Waterman و همکاران در سال ۲۰۱۰ به این نتیجه رسیدند که تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی با آگونیست TLR3 در دوزهای پایین و کوتاه مدت در جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ ضدالتهابی و تحریک سلول‌ها با

سلول مزانشیمال را به سمت ضد التهابی و سرکوبگر سلول‌های T خود واکنش گر که عامل بیماری‌های التهابی و خود ایمن هستند، سوق دهند.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از تمام دوستان و کسانی که در انجام این پروژه یاری رساندند خصوصاً از آقایان مهندس علیاری و مهندس ثانی کارشناسان محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی ارومیه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### References:

- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cell revisiting history, concepts, and assay. *Cell Stem Cell* 2008; 2:313-9.
- Prokop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-4.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4):568-84.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal cell in health and disaes. *Nat Rev immunol* 2008; 8:726-36.
- Caplan AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; 217:318-24.
- Waterman RS, Tomchuk SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *Plos one* 2010;4:e10088.
- DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2010;1-9.
- Steven EA, Robert PA. Variable expression of Toll Like receptor in murine innate and adaptive immune cell. *Int Immunology* 2002; 14(9):1065-74.
- Jones S, Horwood N, Cope Dazzi F. The anti proliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 2007;179: 2824-31.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-22.
- Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 : 37-40.
- Delirez 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. *Cellular Immunology* 2009; 257(1-2): 23-31.
- Ghasemi A. Deproteinized methods of measuring serum nitric oxide graise metho. *J Res Med* 2007; 1(41):43-7.
- Bittencourt RA de C, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE de, Deffune E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortopédica Brasileira* 2006;14(1):22-4.
- Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 2006;84(5):413-21.
- Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by

سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روند افزایش القاء آپوتوزیس در لنفوسیت‌های T همبستگی معنی‌داری را با روند تغییرات غلظت نیتریک اکساید مترشحه از این سلول‌ها نشان نمی‌دهد بنابراین تصور می‌شود که این سلول‌ها مکانیسم‌های مستقل از NO را در القاء آپوتوزیس T بکار می‌گیرند.

### نتیجه گیری

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که تحریک‌های TLR سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش با دوز مناسب آن آگونیست و مدت تماس آن با سلول مزانشیمال در invitro بتوانند

- mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010;1(5):34.
17. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C. 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: 279–89.
18. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol* 2009;182: 7963–73.
19. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohn-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin Z. Toll like receptors and their ligand control mesenchymal stem cell function. *Blood* 2007;109:1422-32.
20. Abarbanell Am, Wang Y, Herman JL, Weil BR, Poynter JA, Manukyan MC, Meldrum DR. Toll-Like receptor2 mediates Mesenchymal stem cell-associated myocardial recovery and VEGF production following acute ischemia-reperfusion injury. *AM J Physiol Heart CircPhysiol* 2010; 298: H1529-H153



## EFFECT OF PEPTIDOGLYCAN-LIPOPOLYSACCHARIDE ON NITRIC OXIDE PRODUCTION BY RAT MESENCHYMAL STEM CELL (MSC) AND INDUCTION OF APOPTOSIS IN ACTIVATED T CELL WITH MSC

Elham Darabi<sup>1\*</sup>, Ahmad Morshedi<sup>2</sup>, Norouz Delirezh<sup>3</sup>, Amir Tokmechi<sup>4</sup>, Aram Mekarizade<sup>5</sup>

Received: 24 Aug , 2013; Accepted: 5 Dec , 2013

### Abstract

**Background & Aims:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult cells which are identified as non-hematopoietic and pluripotent stem cells. Specific stimulation of toll like receptors on the surface of mesenchymal stem cells could change immune responses of these cells into the pre or anti-inflammation phenotype. The aim of this study was to evaluate the effect of peptidoglycan-lipopolysaccharide on the polarization of stem cells into the anti inflammation phenotype and apoptosis induction in T cells.

**Materials & Methods:** MSCs were isolated from the femoral and tibial bone marrow and re-suspended in DMEM media, and kept in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 hours. After that the cell concentration reached to 70 % treated with toll like receptor's agonist with high (10 ng/ml) and low (5 ng/ml) doses for 1 and 12 hours. Then supernatant of cell culture flask were collected for nitric oxide measurement. Apoptosis percentage in T cells was assayed by flowcytometry in the presence of Acridine orange/propidium iodide (AO/PI).

**Result:** The percentage of apoptosis in activated T cells significantly (P<0.05) was higher in long term (12 h) and low dose (5 ngr/ml) treatment with TLR4 agonist than the control. Also, the finding indicated that the nitric oxide production significantly (P<0.05) was higher at short term (1 h) and high dose (10 ngr/ml) of TLR agonist in comparison to the control.

**Conclusion:** It should be concluded that the amount of agonist and duration of treatment in stem cells can affect the apoptosis activity and nitric oxide production in MSCs.

**Keywords:** Toll like receptor's agonist, Mesenchymal stem cell, Apoptosis, Nitric oxide

**Address:** Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran  
Tel: +98 9371990244

**Email:** elidarabi@ymail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 24(12): 1004 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> MSc, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Associate Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Pathobiology & Quality Control Department, Artemia & Aquatic Animal Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>5</sup> PhD Candidate, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran