

تأثیر لیپوپلی ساکارید و پلی ریبوسیتدیلیک اسید به عنوان (آگونیست های TLR)، بر میزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول های T فعال شده توسط سلول های بنیادی مزانشیمال موش

رامین محمدی موالو^{۱*}، احمد مرشدی^۲، امیر توکمه چی^۳، نوروز دلیرز^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۰۸/۲۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: سلول های بنیادی مزانشیمال، سلول های بالغ پیش ساز غیر خون ساز و چندتوان معرفی می گردند. سیمای پیش التهابی یا ضد التهابی این سلول ها در پاسخ های ایمنی با فعال شدن گیرنده های شبه تول خاص ظاهر می گردد. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر لیپوپلی ساکارید و پلی ریبوسیتدیلیک اسید در غلظت های مختلف و زمان های مختلف انکوباسیون بر میزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول های T فعال شده و ارتباط این دو است.

مواد و روش کار: از استخوان های ران و درشتنی به روش فلاشینگ، سوسپانسیون سلولی تهیه و سلول های مزانشیمال به روش چسبندگی پلاستیک جداسازی شدند. پس از بارآمدگی ۷۰ درصد سلول ها، سلول ها با آگونیست های TLR، Poly: IC، (یک و پنج میکروگرم بر میلی لیتر)، LPS (۱۰ و ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر) و غلظت ترکیبی کمینه (Poly: IC) یک میکروگرم بر میلی لیتر و LPS ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (LP) در دو زمان مجزای یک و ۱۲ ساعت تیمار شدند. نیتریک اکساید مایع روئی سلول ها، با روش گریس سنجیده شد. درصد آپوپتوزیس سلول های T، با روش فلوسایتومتری رنگ آمیزی اکریدین-اورنج/پروپیدیوم-آیداید اندازه گیری گردید.

یافته ها: یافته ها نشان داد که Poly: IC بیشترین میزان آپوپتوزیس را در غلظت پایین (یک میکروگرم بر میلی لیتر و پس از گذشت ۱۲ ساعت) اعمال می نماید. درحالی که بیشترین میزان آپوپتوزیس سلول های T در تیمار با LPS در غلظت بالا (۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر و یک ساعت) انکوباسیون به دست آمد ($P < 0.05$). همچنین افزایش میزان آپوپتوزیس سلول های T در ارتباط با تولید نیتریک اکساید می باشد.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که غلظت آگونیست و زمان تیمار سلول های بنیادی با آن می تواند اثرات مختلفی در تولید نیتریک اکساید و فعالیت آپوپتوزی MSCها داشته باشد.

کلیدواژه ها: سلول های بنیادی مزانشیمال، آگونیست، TLR، آپوپتوز، لیپوپلی ساکارید، Poly: IC، سلول های T.

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره دهم، ص ۸۶۴-۸۵۲، دی ۱۳۹۴

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۰۹۱۹۳۰۲۴۲۳۰

Email: Immunoramin@yahoo.com

مقدمه

آزمایشگاهی این سلول ها را در مقادیر زیاد و مناسب جهت اهداف درمانی فراهم می سازد. به نظر می رسد که تقویت پتانسیل های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول های با مداخله در گیرنده های زودرس بیان شده در سطح این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی می تواند کاربرد درمانی تقویت شده ای در درمان بیماری های خودایمن نظیر

سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول های پیش ساز چندتوان غیرخون ساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت های اسکلتی می باشند. ویژگی شاخص این سلول ها سهولت در جداسازی و رشد سریع آن ها در شرایط آزمایشگاهی می باشد. درحالی که همواره پتانسیل تمایزی خود را حفظ می کنند که این خود امکان تکثیر

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۳ استادیار، گروه میکروبیولوژی، بخش باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۴ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

بنیادی مزانشیمال مربوط به قابلیت القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده می‌باشد که کارایی آن در تیمار بیماری‌های خودایمن با واسطه سلول‌های T می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. این اعمال اثر در سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش از طریق تولید NO انجام می‌پذیرد. مهار ازدیاد سلول‌های T توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل کنش بین سلول‌ها و ترشح عوامل محلول باشد (۸). همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی و موشی، علی‌رغم اثر سرکوب‌گری آن‌ها روی تکثیر سلول T، می‌توانند موجب بقای سلول‌های T نیز بشوند. این اثر را می‌توان نتیجه بیش‌تحریکی TCR^{γ} ، تحمل مرگ سلولی القاء شده از فعالیت یا آپوپتوز وابسته به Fas/Fas^l دانست. توضیح آشکار برای این تفاوت می‌تواند تأثیر عوامل محیطی (احتمالاً مرتبط با تقسیم سلولی و ضد مرگ سلولی) بر عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد (۹). در مطالعه پیش‌رو با استفاده از آگونیست‌های TLR3 (Poly: IC)، TLR4 (LPS) با مقادیر مختلف و در زمان‌های انکوباسیون مختلف اقدام به تحریک سلول‌های مزانشیمال موشی (muMSCs) کرده و تأثیر آن بر روی توانایی القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده، میزان تولید NO و ارتباط بین این دو مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش کار

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال:

این مطالعه در Clean Room پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، از آذرماه تا اسفندماه ۱۳۹۰ با سه تکرار مجزا انجام شد. در این پژوهش تعداد ۴۰ سر موش سوری سفید معمولی با سن ۶-۸ هفته و میانگین وزنی 25 ± 5 گرم از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، تهیه گردید. موش پس از تزریق ترکیبی از کتامین^۹ (Alfasan- هلند)-زایلازین^{۱۰} (Alfasan- هلند) (کتامین ۵۰ درصد با غلظت ۱ mg/kg و زایلازین ۲ درصد با غلظت ۰/۵ mg/kg) تحت بیهوشی عمومی قرار گرفت. سپس تحت شرایط آسپتیک، استخوان ران موش به همراه استخوان درشت‌نی از مفصل استخوان لگن جدا شد و نهایتاً این دو استخوان از محل مفصل استخوان ران به استخوان درشت‌نی جدا شد. استخراج مغز استخوان با روش فلاشینگ انجام گردید (۱۵ و ۲۷). سوسپانسیون سلولی به‌دست‌آمده با سرعت

مالتیپل اسکروزیس^۱، روماتوئید آرترید^۲، دیابت نوع I^۳ یا واکنش‌های ازدیاد حساسیتی داشته باشد (۳-۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت‌های با منشأ مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند و البته این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های حمایت‌کننده برای سلول‌های خون‌ساز در مغز استخوان نیز هستند (۴). این سلول‌ها در جوندگان، از بخش‌های دیافیز استخوان‌های درشت‌نی و ران جمع‌آوری می‌گردد (۵). TLR^۴ یکی از گیرنده‌های ایمنی زودرس بیان‌شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند که قادر به تعدیل یا تغییر فعالیت این سلول‌ها می‌شود و اخیراً مشخص شده است که فعال‌سازی TLRهای ویژه در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ پیش‌التهابی MSC1 یا ضدالتهابی MSC2 هدایت کند. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که ویژگی‌های مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهای تعدیل‌کننده ایمنی این سلول‌ها به‌طور مؤثری تحت تأثیر درگیری آگونیست‌های اختصاصی TLRها می‌باشد (۳). به لحاظ ساختمانی و عملکردی TLRها، گلیکوپروتئین‌های غشاء‌گذر تیپ I می‌باشند که یک دومین خارج سلولی غنی از تکرارهای لوسین و یک منطقه داخل سلولی حاوی تکرارهای وارونه انتهای TIR^۵ دارند و از طریق تعامل با آداپتور مولکول‌های حاوی دومین TIR در داخل سلول منجر به فعال شدن آبشاری از القاء فاکتورهای نسخه‌برداری مختلف می‌گردند (۶). TLR4 رسپتور اصلی شناسایی LPS^۶ است.

MD-2 مولکولی است که به بخش خارج سلولی TLR4 متصل شده و پاسخ به LPS را افزایش می‌دهد. TLR4 معمولاً بر سطح سلول ظاهر می‌شود، اما در موش‌های فاقد MD-2 در گلژی یافت می‌شود. لذا به نظر می‌رسد MD-2 برای شکل‌گیری نهایی ساختمان TLR ضروری است (۶). آپوپتوز مرگ فیزیولوژی سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب‌دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هوموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف لنفوسیت‌های خودواکنش‌گر نقش دارد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، منجر به بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و اختلالات خودایمنی می‌گردد (۷). یکی از توانمندی‌های سرکوب ایمنی سلول‌های

⁶ Lipopolysaccharide

⁷ T cell receptor

⁸ Fas-ligand

⁹ Ketamine Hydrochloride

¹⁰ Xylazine

¹ Multiple sclerosis

² Rheumatoid arthritis

³ Type 1 diabetes

⁴ Tool Like receptors

⁵ Terminal inverted repeats

سولفانیلامید، نمک دیازنیوم را می سازد که با NED⁵ ترکیب می شود. ماده رنگی حاصل در جذب نوری با طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط^۶ Reader ELISA (مدل STATFax3200 ساخت کشور آمریکا) اندازه گیری شد و مقادیر با منحنی استاندارد تهیه شده محاسبه گردیدند (۱۰).

جداسازی سلول های طحال موش:

سلول های T از طحال موش به دست آمد. موش پس از تزریق ترکیبی از کتامین (Alfasan-هلمند)-زایلازین (Alfasan-هلمند) (کتامین ۵ درصد با غلظت ۱ mg/kg و زایلازین ۲ درصد با غلظت ۵ mg/kg) تحت بیهوشی عمومی قرار گرفت. تحت شرایط استریل، طحال جداسازی و در پلیت حاوی DMEM قرار داده شد و به روش مکانیکی با استفاده از پیستون سرنگ استریل به طور کامل له گردید. سوسپانسیون سلولی به دست آمده با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله فایکول به آرامی به مجموعه سوسپانسیون سلولی اضافه و با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دما ۱۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سلول های تک هسته ای طحال که در حدفاصل محلول فایکول و سوسپانسیون سلولی واقع شده بودند، توسط پیپت پاستور به آرامی جمع آوری و به منظور حذف فایکول، سلول های تک هسته ای طحال با محیط کشت DMEM مخلوط و با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول های حاصل با محیط کشت DMEM مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند (۱۱). در نهایت تعداد و میزان زنده بودن سلول های تک هسته ای به دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو آبی و لام نئوبار تعیین شد. هر ۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی سلول های T با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیتوهمآگلوتنین (Gibco-انگلستان) افزوده شده به آن ها تحریک گردیدند. در نهایت به مدت ۷۲ ساعت فلاسک های حاوی (سلول های بنیادی مزانشیمی تیماری مجاور شده با سلول های T) به صورت افقی در انکوباتور ۳۷°C با غلظت ۵ درصد، CO₂ انکوبه شدند. به علت تکثیر انفجاری سلول های T به واسطه PHA^۷ و مصرف شدن محیط کشت توسط سلول ها، ۱۲ ساعت بعد از مجاور سازی با سلول های بنیادی مزانشیمی، اقدام به تعویض محیط کشت فلاسک ها شد.

۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. جهت تعیین تعداد و میزان زنده بودن سلول ها به روش رنگ آمیزی با تریپان بلو^۱ (۰/۴ درصد تریپان بلو در PBS^۲) بر روی لام نئوبار مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱×۱۰^۶ سلول به ازای هر میلی لیتر در محیط کشت DMED^۳ (Sigma-Aldrich-آمریکا) همراه با ۱۰ درصد FBS^۴ (Gibco-آمریکا) تهیه شد و به فلاسک T20 cm² (Jetbiofil-کانادا) منتقل و در دما ۳۷ درجه با ۵ درصد CO₂ انکوبه شد.

اولین تعویض محیط های کشت، ۱۲ ساعت بعد از کشت، صورت گرفت. با این تعویض محیط کشت اکثریت سلول های غیر چسبنده ته نشین شده در بین سلول های بنیادی مزانشیمی حذف شدند. با توجه به نوع سلول های کشت شده، غلظت تعداد سلول های موجود در فلاسک ها، زرد شدن محیط های کشت سلول ها به صورت تجربی (کاهش pH محیط کشت و نامناسب شدن مورفولوژی سلول ها) به فاصله هر ۲-۳ روز یک بار محیط کشت سلول ها تعویض شدند. در روز ۷-۱۰ پس از کشت، پاساژ سوم، (۶۰-۷۰) درصد بار آمدگی در فلاسک ها مشاهده شد.

تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال با آگونیست های TLR:

آگونیست های پلی ریبوسیتدیلیک اسید (Poly: IC) (Sigma-Aldrich-آمریکا) و لیوپلی ساکارید (LPS) (Sigma-Aldrich-آمریکا) با سلول های بنیادی مزانشیمی کشت شده، داخل فلاسک ها در غلظت های یک میکروگرم بر میلی لیتر و پنج میکروگرم بر میلی لیتر برای Poly: IC و غلظت های ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر و ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر برای LPS و غلظت ترکیبی کمینه (یک میکروگرم بر میلی لیتر برای Poly: IC و ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر برای LPS) (LP) در زمان های یک و ۱۲ ساعت مجاور سازی انکوبه شدند (۳).

اندازه گیری نیتریک اکساید با تست گریس و مجاور سازی سلول های بنیادی مزانشیمال با سلول های T:

پس از تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال، مایع روئی برداشته شده در زمان های ذکر شده سریعاً به تانک ازت با دمای ۱۹۶- منتقل شد. اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع روئی کشت سلول به روش گریس انجام گردید. این روش بر پایه تبدیل سریع نیتریک اکساید به ترکیبات پایدار نیتريت می باشد. بر این اساس نیتريت در یک محیط اسیدی تبدیل به HNO₂ می شود که با

⁵ N-1 naphthylethylenediamine dihydrochloride

⁶ Enzyme-linked Immunosorbent Assay

⁷ Phytohaemoagglutinin

¹ Trypan blue

² Phosphate Buffered Saline

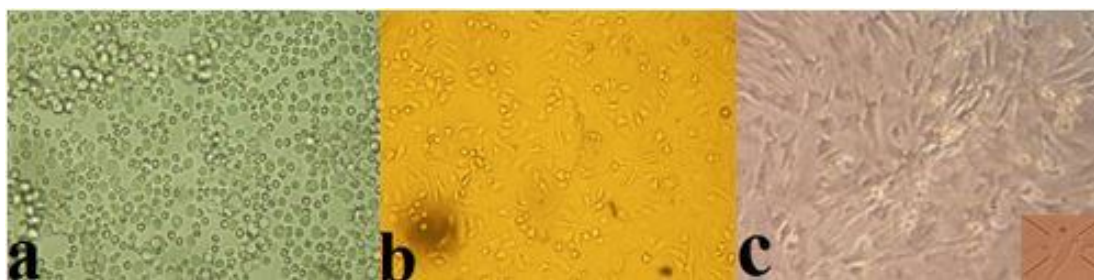
³ Dulbeccos Modified Eagle Medium

⁴ Fetal bovin serum

جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید. پس از ترسیم نمودارهای توصیفی توسط نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۰۷، کنترل outlayer، نرمال بودن توزیع و همگن بودن واریانس‌ها از آزمون واریانس یک طرفه One Way ANOVA و تصحیح Bonferroni استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت $(\text{Mean} \pm \text{SEM})$ گزارش گردید.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال: تصاویر شکل ۱ نشانگر سلول‌های بنیادی مزانشیمال در زمان‌های روز اول، روز هفتم و بعد از پاساژ می‌باشد. در روز اول سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت به همراه دیگر سلول‌های مغز استخوان دیده می‌شوند که در نهایت پس از رسیدن به تراکم ۷۰ درصد و انجام پاساژ، سلول‌های بنیادی مزانشیمال همگونی با مورفولوژی سلول‌های دوکی شکل شبیه فیبروبلاست در پاساژ سوم رؤیت می‌گردد.



روز اول کشت (a)

روز هفتم کشت (b)

شکل (۱): پس از پاساژ (c)

آپوپتوزیس و NO 0.363 ± 0.023 نانومول بر میلی‌لیتر ($P < 0.05$). همان‌طور که می‌توان مشاهده کرد این دو گروه تفاوت معنی‌داری را با دو گروه دیگر، یعنی غلظت کم و انکوباسیون کوتاه‌مدت (LL) و غلظت زیاد و انکوباسیون طولانی‌مدت (HL) در القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T و تولید NO در سلول‌های muBMSCs نشان می‌دهند. ولی بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در تحریک سلول‌های muBMSCs مشاهده نمی‌گردد. در راستای تولید NO هم، غلظت کم و انکوباسیون کوتاه‌مدت (LL) 0.396 ± 0.004 نانومول بر میلی‌لیتر نیز توانسته اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل (C) 0.363 ± 0.023 نانومول بر میلی‌لیتر در میزان تولید NO ایجاد نماید ($P < 0.05$).

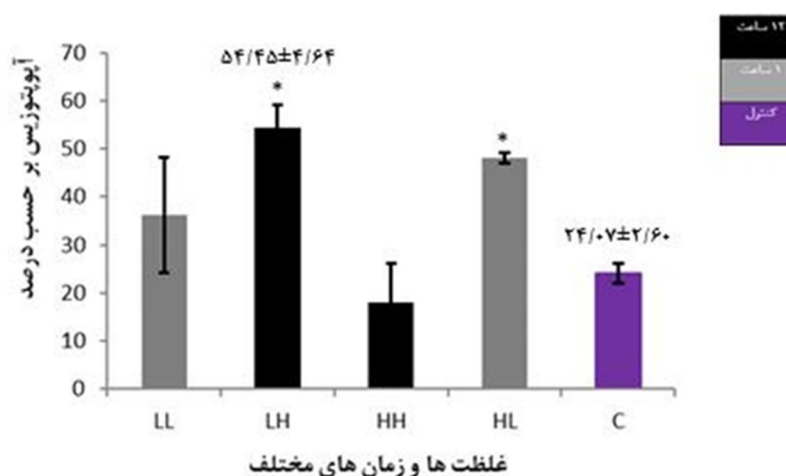
سنجش آپوپتوز با فلوسایتومتري: جهت انجام سنجش آپوپتوز در سلول‌های T از دستگاه فلوسایتومتري [DAKO (Partec-آلمان) و نرم‌افزار Flow Max] استفاده شد. به این ترتیب که پس از ۷۲ ساعت سلول‌های T موجود در مایع روئی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. تعداد $10^6 \times 1$ سلول T به داخل فالكون‌ها منتقل گردید و ۲ میکرولیتر آنتی‌بادی Anti-CD3 (eBioscience-آلمان) به آن‌ها افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس ۱۰ میکرولیتر رنگ اکریدین-اورنج (AO^1) به آن‌ها افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردیدند و در نهایت پس از افزودن دو میکرولیتر پروپیدیم-آیداید (PI^2) به هر نمونه توسط دستگاه فلوسایتومتري میزان آپوپتوز در سلول‌های T اندازه‌گیری گردید (۸).

آنالیز آماری داده‌ها:

تیمار سلول‌ها با Poly: IC با muBMSCs در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون: همان‌طور که در (نمودارهای ۱ و ۲) می‌توان مشاهده نمود، استفاده از Poly: IC، در گروه غلظت کم و انکوباسیون طولانی‌مدت (LH)، توانست $54/45 \pm 4/64$ درصد آپوپتوزیس در سلول‌های T و میزان 0.632 ± 0.046 نانومول بر میلی‌لیتر NO ایجاد نماید و همچنین در گروه غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه‌مدت (HL)، نیز توانست در سلول‌های T $48/02 \pm 1/16$ درصد آپوپتوزیس و میزان 0.620 ± 0.020 نانومول بر میلی‌لیتر NO ایجاد نماید که سلول‌های muBMSCs را بیشتر از بقیه گروه‌ها تحریک کرده و باعث القاء آپوپتوزیس بیشتری در سلول‌های T فعال شده و تولید NO گردد. (دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (C) $24/7 \pm 2/06$ درصد

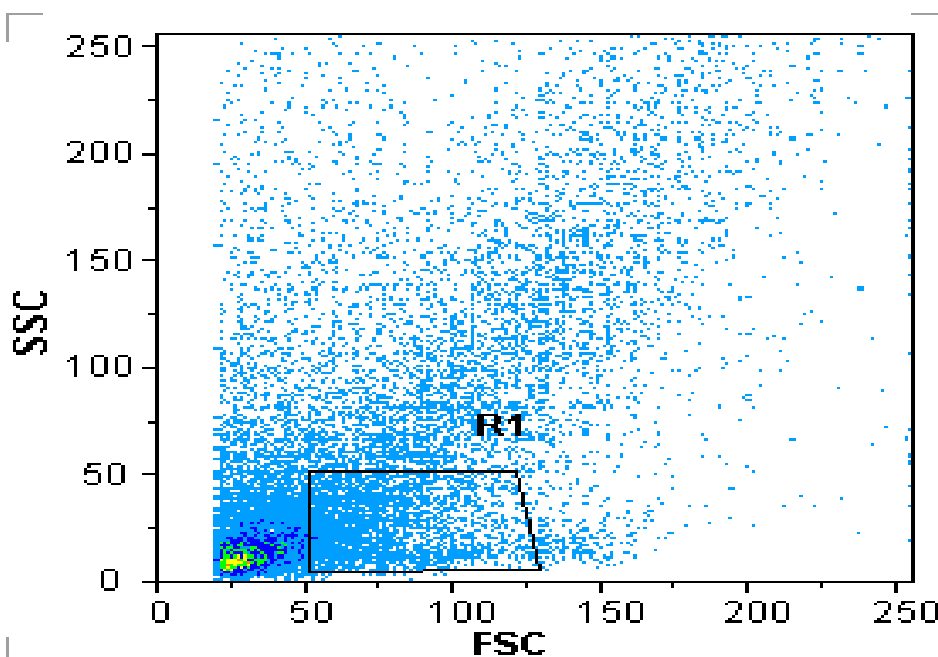
² Propidium Iodide

¹ Achridin Orange



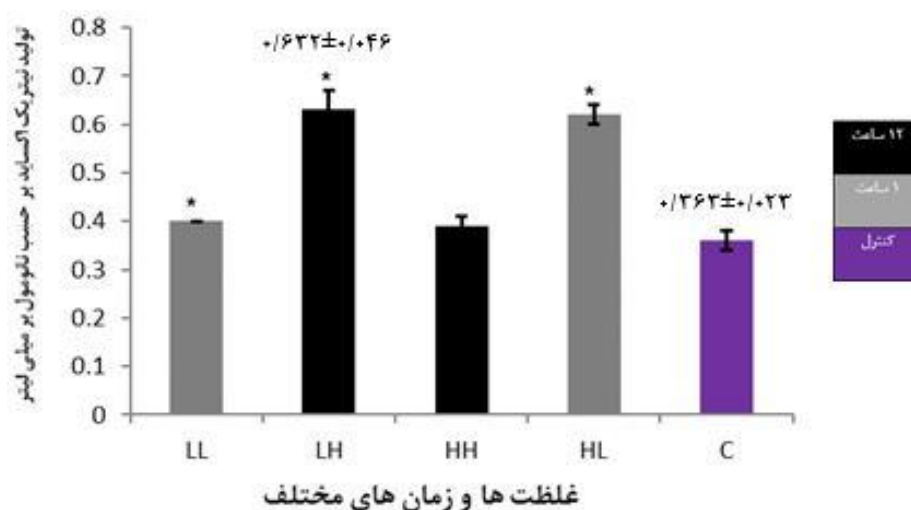
نمودار (۱): مقایسه توانایی سلول های muBMSCs تیمار شده با Poly: IC در غلظت های مختلف و در زمان های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول های T فعال شده.

(*) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه های مشخص شده با گروه کنترل است.
 LL غلظت کم و انکوباسیون کوتاه مدت (۱ ساعت)، LH غلظت کم و انکوباسیون طولانی مدت (۱۲ ساعت)،
 HH غلظت زیاد و انکوباسیون طولانی مدت (۱۲ ساعت)، HL غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه مدت (۱ ساعت)،
 C کنترل



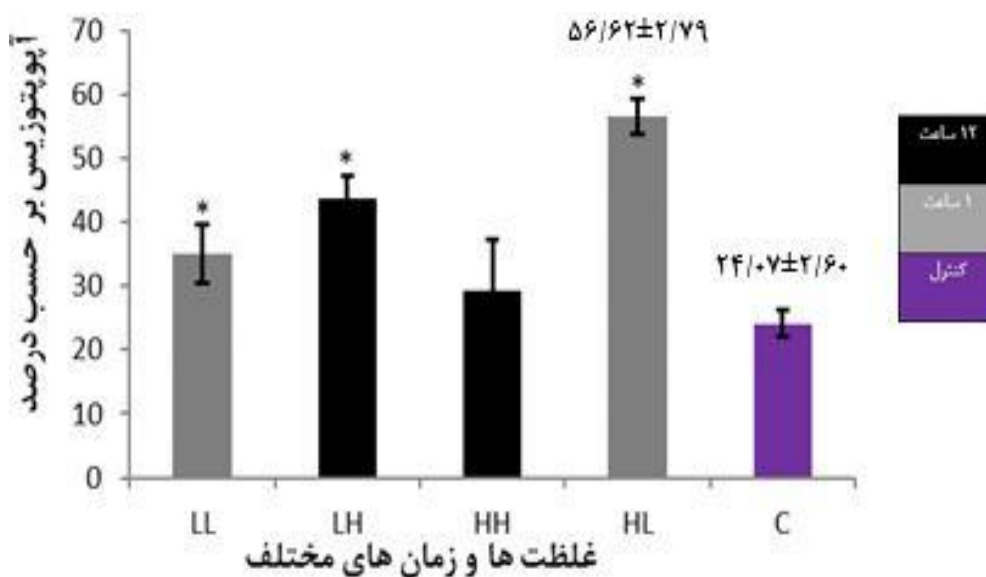
شکل (۲): الگوی هیستوگرام فلوسایتومتری جهت بررسی سلول های T در حضور غلظت کم Poly: IC و مدت انکوباسیون ۱۲ ساعت.
 SSC (گرانولیتة سلول) و FSC (اندازه سلول)

یافته ها نشان داد که در مورد اثرات Poly: IC بالاترین میزان آپوپتوزیس در غلظت کم ۱ میکروگرم بر میلی لیتر و مدت انکوباسیون ۱۲ ساعت به دست آمد (شکل ۲).

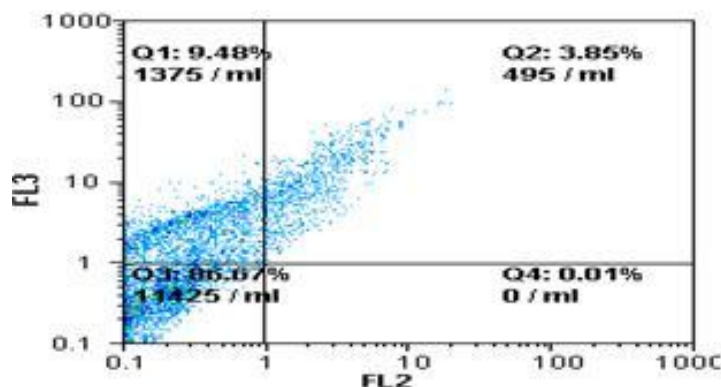


نمودار (۲): مقایسه اثر غلظت‌های مختلف Poly: IC در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های muBMSCs در تولید NO. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$) بین گروه‌های مشخص شده با گروه کنترل است.)

تیمار سلول‌ها با muBMSCs با LPS در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون: داده‌های حاصل از مطالعه حاضر حاکی از آن بود که استفاده از LPS در گروه‌های، غلظت کم و انکوباسیون کوتاه‌مدت (LL) $34/95 \pm 4/64$ درصد، غلظت کم و انکوباسیون طولانی‌مدت (LH) $43/77 \pm 3/38$ درصد و غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه‌مدت (HL) $56/62 \pm 2/79$ درصد، نسبت به گروه کنترل (C) $24/07 \pm 2/60$ درصد باعث القاء آپوپتوزیس در درصد بیشتری از سلول‌های T فعال شده گردید ($P < 0.05$). البته لازم به ذکر است که بیشترین اختلاف مربوط به گروه غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه‌مدت (HL) $56/62 \pm 2/79$ درصد می‌باشد (نمودار ۳).



نمودار (۳): مقایسه توانایی سلول‌های muBMSCs تیمار شده با LPS در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول‌های T فعال شده. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$) بین گروه‌های مشخص شده با گروه کنترل است.)



نمودار (۴): نمودار نقطه‌ای حاصل از بررسی آپوپتوز القاء شده در سلول‌های T در حضور غلظت بالای LPS و مدت انکوباسیون ۱ ساعت. Q1: آپوپتوز اولیه، Q2: آپوپتوز تأخیری، Q3: سلول زنده، Q4: سلول نکروتیک.

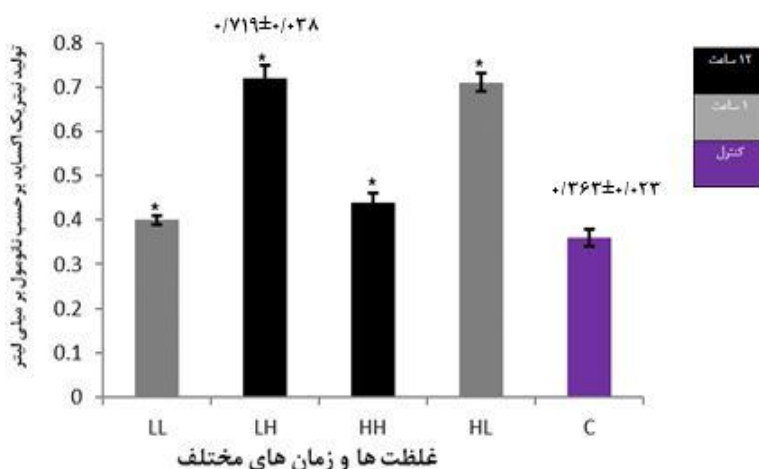
نانومول بر میلی لیتر بود که این اختلاف معنی‌دار قابل مشاهده می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار ۵).

تیمار سلول‌های *muBMSCs* با غلظت ترکیبی کمینه *LPS+Poly: IC (LP)* در زمان‌های مختلف انکوباسیون:

همان‌طور که در (نمودار ۶) می‌توان مشاهده کرد استفاده از این ترکیب کمینه (LP) با غلظت‌های *LPS 10 ng/ml+Poly: IC* ($1 \mu\text{g/ml}$) در زمان انکوباسیون یک ساعت باعث القاء آپوپتوزیس در درصد بیشتری از سلول‌های T فعال شده گردیده است $40/75 \pm 5/81$ درصد که این اختلاف با گروه کنترل (C) $24/08 \pm 2/07$ درصد به صورت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). البته در زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت هم باعث القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده گردید $35/17 \pm 4/88$ درصد که این اختلاف هم با گروه کنترل (C) $24/08 \pm 2/07$ درصد به صورت معنی‌دار است ($P < 0.05$).

در مورد LPS بالاترین آپوپتوزیس در غلظت بالا، ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر و مدت انکوباسیون یک ساعت به دست آمد، به‌طوری‌که نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) (نمودار ۳ و ۴).

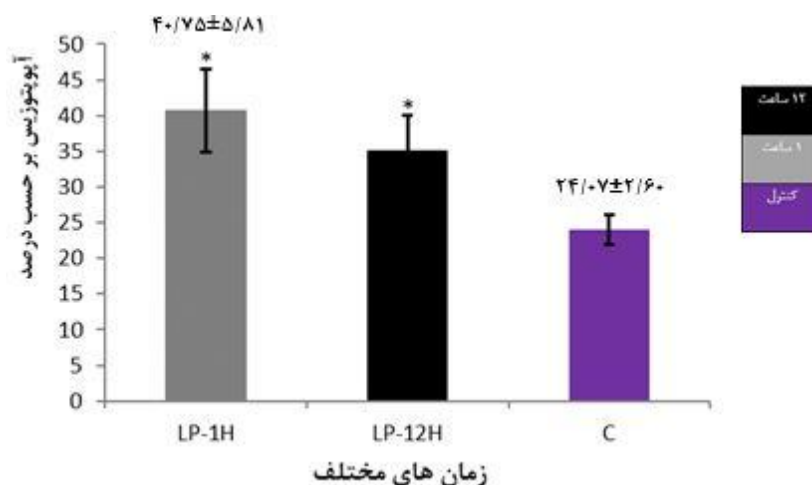
در رابطه با میزان تولید NO، گروه غلظت کم و انکوباسیون طولانی مدت (LH)، $0/719 \pm 0/038$ نانومول بر میلی لیتر بیشترین اختلاف را با گروه کنترل (C) $0/363 \pm 0/023$ نانومول بر میلی لیتر ایجاد کرد ($P < 0.05$). البته شایان ذکر است که سایر گروه‌ها هم باعث ایجاد یک اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (C) $0/363 \pm 0/023$ نانومول بر میلی لیتر گردیدند ($P < 0.05$). به‌طوری‌که در گروه‌های غلظت کم و انکوباسیون کوتاه مدت (LL) میزان تولید NO $0/408 \pm 0/012$ نانومول بر میلی لیتر و غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه مدت (HL) میزان تولید NO $0/707 \pm 0/026$



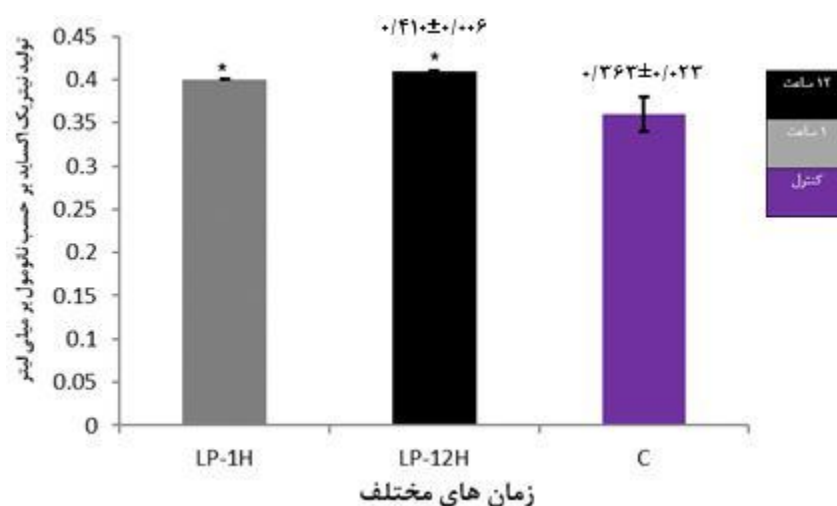
نمودار (۵): مقایسه اثر غلظت‌های مختلف LPS در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های *muBMSCs* در تولید NO. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه‌های مشخص شده با گروه کنترل است).

است ($P < 0.05$). البته لازم به ذکر است که هر دو زمان انکوباسیون باعث تولید NO بیشتری نسبت به گروه کنترل (C) 0.363 ± 0.023 گردیده است که این اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) (نمودار ۷).

از لحاظ میزان تولید NO می‌توان گفت که زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت 0.410 ± 0.006 نانومول بر میلی‌لیتر، نسبت به زمان انکوباسیون یک ساعت 0.402 ± 0.003 نانومول بر میلی‌لیتر، باعث تولید NO بیشتری در مقایسه با گروه کنترل (C) 0.363 ± 0.023 نانومول بر میلی‌لیتر گردیده است که این اختلاف به صورت معنی‌دار



نمودار (۶): مقایسه توانایی سلول‌های muBMCs تیمار شده با غلظت ترکیبی کمینه LPS+Poly: IC (LP) و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول‌های T فعال شده.
 (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه‌های مشخص شده با گروه کنترل است).



نمودار (۷): مقایسه اثر غلظت ترکیبی کمینه LPS+Poly: IC (LP) و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های muBMCs در تولید NO.
 (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه‌های مشخص شده با گروه کنترل است).

بحث و نتیجه گیری

پلاستیکی در محیط آزمایشگاهی تکثیر می‌یابند (۱۷). ویژگی شاخص این سلول‌ها سهولت نسبی امکان جداسازی و تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۲، ۱۸) که در کنار پتانسیل سرکوب

سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمعیت ناهمگون سلولی هستند که به صورت کلنی‌هایی شبیه فیبروبلاست، با چسبندگی به سطوح

ایمنی و تمایزی کارآمد، این سلول ها را به ابزاری بالقوه در برنامه درمانی بیماری های خودایمن تبدیل نموده است که طی آن پاسخ های التهابی خودواکنش گر مسبب اصلی آسیب های بافتی واقع می شوند (۱۴). از این رو به نظر می رسد که تقویت پتانسیل های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول ها با مداخله در گیرنده های زودرس بیان شده در سطح این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی بتواند کاربرد درمانی تقویت شده ای را برای این سلول ها در درمان بیماری های خودایمن التهابی به همراه داشته باشد (۳-۱). TLR ها یکی از گیرنده های ایمنی بیان شده در سطح سلول های بنیادی مزانشیمال می باشد که می تواند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت الشعاع قرار دهند. Tomchuch و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که نه تنها TLR های مختلفی بر سطح سلول های بنیادی مزانشیمال بیان می شوند، بلکه متعاقب تحریک و متعهد شدن آگونیست های TLR ها، این سلول ها قادر به مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهای با تکثیر قوی ایمونومدیا لتوری هستند (۱۶). اخیراً مشخص شده است تحریک TLR های ویژه در سطح سلول های بنیادی مزانشیمال می تواند پاسخ های ایمنی منتج از این سلول ها را به سمت فنوتیپ های پیش التهابی (MSC1) یا ضد التهابی (MSC2) جهت دهی کند. بر این اساس فنوتیپ پیش التهابی یک نوع پاسخ زودرس سلول به آسیب های بافتی بوده و پیش برنده مقطعی یا گذرای روند التهاب به وقوع پیوسته می باشند. در مقابل فنوتیپ ضد التهابی نقشی مشابه مونوسیت ها در روند التیام و ترمیم جراحات و آسیب های بافتی دارند (۱، ۳، ۲۶). یکی از توانمندی های فنوتیپ ضد التهابی افزایش تولید NO (نیتریک اکساید ذخایر تریپتوفان) (اسید آمینه ضروری)، تکثیر سلوهای T را تجزیه می کند (در موش) (۲۵) یا IDO^۱ (در انسان) (۲۱) و تقویت توانایی القاء آپوپتوزیس در سلول های T فعال شده می باشد (۱، ۲۴). هر چند مطالعات قبلی عملکرد ترمیم و ضد التهابی سلول های بنیادی مزانشیمال در حال استراحت را طی مطالعات متعدد مورد تأیید قرار داده اند (۱۸). به نظر می رسد که این توانایی در صورت جهت گیری این سلول ها به سمت فنوتیپ ضد التهابی پاسخ های سرکوب کننده ایمنی تقویت شده ای را به دنبال داشته باشد. مطالعات نشان می دهند که از میان TLR های مختلف بیان شده به وسیله سلول های بنیادی مزانشیمال، TLR های ۲، ۳، ۴ بیشترین تأثیر را بر جهت گیری پاسخ این سلول ها به سمت فنوتیپ های یاد شده داشته باشند (۶، ۱۹).

نخستین بار Mourez و همکاران نشان دادند که تحریک گیرنده های TLR3 و TLR4 در سلول های مزانشیمال موشی منجر به افزایش تولید واسطه های پیش التهابی IL-8، CCL5^۲، IL-6، IL-1^۳ می شود. همچنین در طی مطالعه ای پیرامون سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی نتایج مشابهی به دست آمد (۲۰، ۲۱، ۲۶). مطالعات بعدی نشان داد که علاوه بر نوع TLR درگیر، غلظت آگونیست TLR به کار رفته و مدت زمان تحریک سلول ها با آگونیست مزبور می تواند در جهت گیری سلول به سمت یکی از دو فنوتیپ پیش التهابی و ضد التهابی مؤثر باشد. بنابراین بر خلاف 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 سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی با آگونیست TLR3 در غلظت های پایین و کوتاه مدت در جهت گیری سلول ها به سمت فنوتیپ ضد التهابی و تحریک سلول ها با آگونیست TLR4 در غلظت های پایین و کوتاه مدت در جهت گیری سلول ها به سمت فنوتیپ پیش التهابی مؤثر می باشد. مطالعات قبلی درگیری گیرنده TLR2 را بر افزایش بقاء و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمال نشان داده اند (۱، ۳). با این حال Pevsner-Fischer و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده اند که درگیری این گیرنده ها تأثیری بر پتانسیل های ضد التهابی سلول های MSC ندارد (۱۹). هر چند Abarbanell و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده اند که تحریک این سلول ها با آگونیست های TLR2 به طور چشم گیری می تواند منجر به افزایش توانایی های ترمیمی این سلول ها در آسیب های میوکاردیت قلبی شود که نشان دهنده جهت گیری پاسخ سلول های مزانشیمال به سمت فنوتیپ ضد التهابی می باشد (۲۲).

در تلاش برای حل این تناقضات یا همراهی با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر اقدام به تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال با آگونیست های TLR3 و TLR4 در برنامه های زمانی و غلظت متفاوت گردید. در ادامه تغییرات فعالیت آپوپتوتیک سلول ها در مواجهه با سلول های T فعال شده به عنوان شاخصی از تغییرات جهت گیری سلول ها به سمت فنوتیپ های پیش التهابی یا ضد التهابی مورد توجه قرار گرفت. بر این اساس در نتیجه جهت گیری پاسخ سلول ها به سمت فنوتیپ ضد التهابی به علت افزایش بیان مولکول های سطحی تنظیمی (PDL-1^۴، Gal-1^۴ Fas-I و مدیاتورهای سمی (IDO، NO) و مهارکننده های

^۱ Indoleamine 2,3-dioxygenase^۲ Chemokine (C-C motif) ligand 5^۳ Interleukin-1^۴ Galectin-1^۵ Programmed Death Ligand-1

بودند. از این رو استفاده از غلظت ترکیبی کمینه (Poly: IC) (LP) و LPS توصیه نمی‌گردد.

با توجه به اینکه در تیمارهای انجام پذیرفته بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روند القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T همبستگی معنی‌داری را با روند تغییرات غلظت نیتریک اکساید مترشحه از این سلول‌ها نشان می‌دهد، بنابراین تصور می‌شود که در این سلول‌ها تولید NO مکانیسم اصلی القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T باشد (۲، ۲۳) هر چند افزایش بیان سطحی مولکول‌های TGF- β ، Gal-1، FasL-1 و غیره که به‌طور مستقیم در پیشبرد پروسه آپوپتوزیس نقش ایفاء می‌کنند نیز محتمل می‌باشد (۱۴-۱۲).

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که تحریک TLRهای سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش، که بتوانند سلول مزانشیمال را به سمت سلول ضدالتهابی و سرکوبگر سلول‌های T خودواکنش‌گر که عامل بیماری‌های التهابی و خودایمن هستند سوق دهند، با غلظت مناسب آن آگونیست و مدت تماس آن با سلول مزانشیمال در شرایط آزمایشگاهی بستگی و ارتباط دارد. جهت موفقیت بیشتر در برنامه‌های سلول درمانی مربوط به بیماری‌های خودایمن به کار گرفت.

تشکر و قدردانی

این اثر پژوهشی با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است.

بدینوسیله نویسندگان مراتب کمال تشکر و قدردانی خود را از همکاران محترم آزمایشگاه ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه اعلام می‌دارند.

References:

1. Bunnell B, Betancourt A, Sullivan D. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell ResTherapy* 2010; 1(5): 34.
2. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2010;2010:865601.
3. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell

(β^6 , IL-10, PGE2 7) انتظار می‌رود (۲، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۲۳) تعداد بیشتری از سلول‌های T تحریک شده در سیستم هم‌کشت با سلول‌های MSC دچار آپوپتوز شوند.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت پروآپوپتوتیک سلول‌های T گروه تیمار شده با Poly: IC در غلظت کم و انکوباسیون طولانی‌مدت و LPS در غلظت زیاد و انکوباسیون کوتاه‌مدت افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در واقع با تحریک TLR4، MSCها اقدام به ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی 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 التهاب در ریز محیط آسیب دارند و می‌توانند منجر به شکل‌گیری پاسخ‌های ضدالتهابی با آغاز روندترمیم بافتی گردند. به علاوه بخشی از تفاوت پاسخ سلول‌های مزانشیمال به غلظت‌های متفاوت این تیمارها می‌تواند در نتیجه القاء تحمل یا فرسایشی باشد که غلظت‌های بالای آگونیست‌ها بر خلاف غلظت‌های پایین در عملکرد این سلول‌ها اعمال می‌کنند. این نتایج می‌تواند در توافق با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی باشد که تأثیرات متفاوت برنامه‌های تحریک‌سازی سلول با پروتوکول‌های غلظت و زمان مختلف آگونیست‌های TLR را در سلول‌های بنیادی مزانشیمال نشان می‌دهد (۲، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۲۳). نظر به اینکه در تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت ترکیبی کمینه (Poly: IC) (LP) و LPS میزان درصد آپوپتوزیس کم‌تری در سلول‌های T، نسبت به تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیست‌های Poly: IC و LPS به‌طور جداگانه، ایجاد کرد که دارای اختلاف معنی‌داری نیز

- (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE* 2010;5(4):e10088.
4. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2007;149(2):353–63.
5. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells

⁷ Prostaglandine E2

⁶ Transforming Growth Factor- β

- isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006;48(6):361–70.
6. Miggin SM, O'Neill LAJ. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006;80(2):220–6.
 7. Wyllie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen ID, Lockshin RA, editors. *Netherlands: Cell death in biology and pathology Springer Netherlands*; 1981. p. 9–34.
 8. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106(5): 1755-61.
 9. Gregory CA, Perry AS, Reyes E, Conley A, Gunn WG, Prockop DJ. Dkk-1-derived Synthetic Peptides and Lithium Chloride for the Control and Recovery of Adult Stem Cells from Bone Marrow. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2309-23.
 10. Malekinejad H, Taheri-Brujerdi M, Janbaz-Acyabar H, Amniattalab A. Silymarin regulates HIF-1 alpha and iNOS expression in the brain and gills of hypoxic-reoxygenated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Biol* 2012;15(3):261–73.
 11. Hay FC, Westwood OMR. Isolation of Cells. *Practical Immunology*. New Jersey: Blackwell Science Ltd; 2008. p. 179-202.
 12. Mazar J, Thomas M, Bezrukov L, Chanturia A, Pekurnaz G, Yin S, et al. Cytotoxicity Mediated by the Fas Ligand (FasL)-activated Apoptotic Pathway in Stem Cells. *J Biol Chem* 2009; 284(33): 22022-8.
 13. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(1): 2.
 14. Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(12): 1156-66.
 15. 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. *Cell Immunol* 2009;257(1-2):23–31.
 16. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 2006; 84(5): 413-21.
 17. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 726-36.
 18. Da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20(5): 419-27.
 19. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rouso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007; 109: 1422-32.
 20. 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: 279-89.
 21. Wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Weil BR, Manukyan MC, Poynter JA, et al. TLR4 Inhibits Mesenchymal Stem Cell (MSC) STAT3 Activation and Thereby Exerts Deleterious Effects on MSC-Mediated Cardioprotection. *Plos one* 2010; 5(12): e14206.
 22. 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: 529-36.
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. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int J Oncol* 2011; 38(2): 385-90.
25. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 37-40.
26. 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.
27. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid AA, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* 2012; 147(1-2): 47-54.

EFFECT OF LPS AND POLY: IC (TLR AGONISTS) ON NITRIC OXIDE PRODUCTION AND APOPTOSIS INCUBATION IN ACTIVATED T CELLS BY MOUSE MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCS)

Ramin Mohammadi Mavallo^{*1}, Ahmad Morshedi², Amir Tukmechi³, Norouz Delirez⁴

Received: 16 Sep, 2015; Accepted: 20 Nov, 2015

Abstract

Background & Aims: Mesenchymal stem cells (MSCs) were introduced as multipotent non-hematopoietic precursor adult cells. Pre or anti-inflammatory features of these cells appear on immune responses by activating specific tool like receptors (TLRs). The aim of this study was to evaluate the effect of Lipopolysaccharide and Polyribocytidylic Acid on different concentration and times of incubation on nitric oxide production and apoptosis induction in activated T-cells.

Materials & Methods: Suspension cells were prepared through the femural and tibial bones by flushing method; and Mesenchymal cells were isolated by plastic adhesion technique. When the cultures reached % 70 confluence, cells treated with TLR agonists, Poly: IC (1 and 5 µg/ml), LPS (10 and 20 ng/ml) and the lowest combination concentrations (Poly: IC 1µg/ml and LPS 10ng/ml) (LP) at two different times, 1 and 12hr. Nitric oxide of cell surface liquid were measured by Griess (year) method. Apoptosis percentage in T cells was assayed by flowcytometry in the presence of Achridin orange/propidium iodide (AO/PI).

Results: The results showed that Poly: IC could induce the highest T cells apoptosis at low concentration (1 µg/ml) after 12hr incubation. But, LPS could cause T cells apoptosis at high concentration (20 ng/ml) after 1hr incubation (P<0.05). Also, an increase in T cells apoptosis could be related to nitric oxide production.

Conclusion: These findings suggest that the concentration of agonist and treatment period of the stem cells could affect nitric oxide production and apoptotic activity in MSCs.

Keywords: MSCs, agonist, TLR, apoptosis, Poly: IC, LPS, T cells.

Address : Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: +98 9193024230

Email: Immunoramin@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 26(10): 864 ISSN: 1027-3727

¹ MSc, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Associate Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Microbiology, Division of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Associate Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran