Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 21, Issue 2, Summer 2015
Pages: 91-96
Type: Original Research

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
[1]Microbiology 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 آهنگران* PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نوروز دلیرژ PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اهداف: سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان به‌دلیل 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 جداشده از مغز استخوان فمور و تیبیای موش صحرایی نر ۸-۶هفته‌ای در محیط کشت اختصاصی کشت داده شد. پس از بلوغ، مایع رویی حاصل از سلول‌های مزانشیمی با استروژن ۱۰ و ۲۰نانومولار به‌مدت 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 نیتروبلوتترازولیوم) 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 تیمارشده با دوز ۱۰نانومولار و ۲۰نانومولار استروژن نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت. درصد فاگوسیتوز بعد از تیمار با دوزهای ۱۰نانومولار و ۲۰نانومولار، نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار بود. بین درصد فاگوسیتوز دوزهای ۲۰نانومولار و ۱۰نانومولار نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). میزان آپوپتوز در گروه ۱۰نانومولار و ۲۰نانومولار 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 پروکسیدهیدروژن در نوتروفیل‌های فعال‌شده، 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)، نیتریک‌اکسید، PGE (پروستاگلاندین E)، $HLA\text{-}G_5$ (آنتی‌ژن گلبول سفید انسانی) محلول، گالکتین ۳ و HGF (فاکتور رشد هپاتوسیت) 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 القاشده 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 اینترلوکین۱۰ 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

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 ازقبل‌انجام‌گرفته و پروتکل *بیتن‌کورت* و همکاران [۹] انجام شد. موش‌های صحرایی از طریق قرارگرفتن در ظرف حاوی دی‌اتیل‌اتر آسان‌کشی شدند و سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان فمور و تیبیای موش صحرایی ۸-۶هفته‌ای، با عمل فلاشینگ سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (سیگما؛ ایالات متحده) استحصال و پس از سانتریفوژ ۱۲۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و پس از شمارش سلولی به‌همراه FBS (سرم جنین گوساله) ۱۵٪ با دمای ۳۷°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 *رضاپور و مجیدی* [۱۰] انجام گرفت. به‌طور خلاصه در این روش، نمونه خون محیطی هپارینه (۱۰واحد بر میلی‌لیتر) مستقیماً از قلب موش صحرایی گرفته شد. سپس خون به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ رقیق شده و سپس به‌آرامی بر مگلومین ۲۵٪ (شرکت داروپخش؛ ایران) لود شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت سلولی ته‌فالکون دو مرتبه توسط آب مقطر لیز شده و پس از اضافه‌نمودن سرم فیزیولوژی ۲/۵۵٪ به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت با شست‌وشوی پلیت سلولی با سرم دکستروز ۵٪ (سیگما؛ ایالات متحده) به‌میزان ۴×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر همگن شد.

مجاورسازی مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تیمارشده با بتااسترادیول با سلول‌های نوتروفیل: پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی تیمارشده سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمارشده با استروژن ۱۰ و ۲۰نانومولار [۱۱] موجود در فلاسک در یک لوله فالکن ۱۵میلی‌لیتر استریل جمع‌آوری شد. مایع رویی حاصله به یک پلیت ۲۴خانه ته‌تخت انتقال داده شد، به‌طوری که کف خانه‌ها با مایع رویی پوشانده شد. سپس ۵×۱۰^{۶}میلی‌لیتر سلول نوتروفیل به‌همراه FBS ۱۰٪ به داخل هر خانه حاوی مایع رویی اضافه شد و سپس به‌مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۳۷°C با ۵٪ CO_2 و رطوبت ۸۰٪ انکوبه شدند. بعد از گذشت مدت‌زمان انکوباسیون، نوتروفیل‌ها برای انجام آزمون‌های تکمیلی جداسازی شدند [۱۲].

سنجش زنده‌مانی نوتروفیل در مواجهه با محلول رویی سلول مزانشیم: برای سنجش زنده‌مانی نوتروفیل در مواجهه با محلول رویی سلول‌های مزانشیمی از کیت آنکسین- پروپیدیوم‌یدید (Sigma Aldrich, Cat NO: 51-6710AK؛ ایالات متحده) استفاده شد. پس از دو بار شست‌وشوی سلول نوتروفیل انکوبه‌شده با محلول رویی سلول مزانشیم، در ۲۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۵دقیقه، سلول‌ها در یک‌میلی‌لیتر بایندینگ‌بافر با تراکم ۳×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیون تهیه شدند. میزان ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون فوق با ۵میکرولیتر اکریدین‌اورنج (سیگما؛ ایالات متحده) و ۵میکرولیتر PI (پروپیدیوم‌یدید) ترکیب شده و در محیط تاریک و دمای آزمایشگاه به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۴۰۰میکرولیتر از محلول بایندینگ‌بافر به میکروتیوپ، ۵۰۰میکرولیتر از محلول فوق با PBS (سیگما؛ ایالات متحده) رقیق شده و میزان زنده‌مانی (درصد سلول سالم، آپوپتوز و نکروزشده) 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 ۳۷°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 ۲۰۰۰دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و شست‌وشو داده شد. این عمل دو بار انجام شد و در آخر میزان ۱×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر به‌منظور اپسونیزاسیون در محیط کشت RPMI (Sigma Aldrich؛ ایالات متحده) که دارای ۱۰٪ سرم تازه موش صحرایی نر است، به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوباسیون شد [۱۴].

آپوپتوز: به‌طور خلاصه، نوتروفیل با مایع رویی سلول‌های مزانشیم تیمارشده و نشده با استروژن به‌مدت ۴ ساعت مجاور شد. پس از این مدت در ۲۰۰۰دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و به‌مقدار ۱۰لاندا اکریدین‌اورنج اضافه و ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۳۷°C انکوباسیون شد. سپس مقداری محیط کشت روی آن ریخته و دو بار در ۲۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی خالی و به پلیت سلولی ته محلول مقدار ۱۰لاندا از PI اضافه و ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. سپس مقداری محیط روی آن ریخته در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ

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 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 دور ۲۰۰۰دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و شست‌وشو داده شد. دو مرتبه این عمل انجام شد و در آخر میزان ۱×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر به‌منظور اپسونیزاسیون در محیط کشت RPMI که دارای ۱۰٪ سرم تازه موش صحرایی نر است، به‌مدت ۳۰ دقیقه در $۳۷^{\circ}C$ انکوباسیون شد [۱۴]. ۱۰۰لاندا سوسپانسیون نوتروفیل به‌مدت ۲ ساعت با مایع رویی سلول‌های مزانشیم تیمارشده با استروژن و نیز نمونه کنترل، مجاور شد. سپس از این سوسپانسیون روی لام استریل ریخته و ۱۰۰میکرولیتر از مخمر اپسونیزه‌شده به آن اضافه شد تا مخمر در دسترس نوتروفیل قرار گیرد. این لام به‌مدت یک ساعت در $۳۷^{\circ}C$ انکوبه شد. پس از این زمان و خشک‌شدن لام، با فرمالین۱۰٪ 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 نیتروبلوتترازولیوم (NBT): این آزمایش برای سنجیدن میزان تولید واسطه‌های فعال اکسیژن در سلول نوتروفیل است. برای این آزمایش مقدار ۱۵میکرولیتر از نوتروفیل‌هایی که مرحله بیگانه‌خواری با مخمر را انجام داده‌اند با تراکم ۴×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر با ۱۵میکرولیتر 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 به‌مدت یک ساعت در دمای $۳۷^{\circ}C$ انکوباسیون شد و بعد از این مرحله ۴۰۰میکرولیتر محلول N–N– دی‌متیل‌فورماید (سیگما؛ ایالات متحده) به این سوسپانسیون افزوده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با دمای $۴^{\circ}C$ و ۳۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از این مرحله مقدار ۲۰۰میکرولیتر از مایع رویی هم از نمونه کنترل هم نمونه تیمارشده با استروژن برداشته و در چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد. سپس دانسیته نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۰نانومتر با دستگاه الایزا 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 به‌صورت میانگین آماری در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ بیان شدند.

یافته‌ها

میزان آپوپتوز مایع رویی در گروه تیمارشده با استروژن با دوز ۱۰نانومولار (۲/۱±۵۲/۹) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (۲/۱±۴۱/۱۶) نشان داد ($p<۰/۰۵$). به‌علاوه گروه تیمارشده با استروژن با دوز ۲۰نانومولار (۴/۲±۶۲/۴) در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۱$). اما بین دوزهای ۲۰نانومولار و ۱۰نانومولار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

درصد فاگوسیتوز در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی بعد از تیمار با هر دو دوز ۱۰نانومولار ($p<۰/۰۱$) و ۲۰نانومولار ($p<۰/۰۰۱$) استروژن، در مقایسه با گروه کنترل (۱/۱±۱۵/۷) دارای افزایش معنی‌دار بود. از طرف دیگر، بین دوزهای ۲۰نانومولار (۰/۴±۳/۹) و ۱۰نانومولار (۱/۳±۹/۱) نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$).

میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل مجاورشده با مایع رویی سلول‌های مزانشیمی در گروه تیمارشده با دوز ۱۰نانومولار استروژن (۰/۰۳۸±۰/۵۰۴) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۲۱±۰/۶۱۳) دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). گروه تیمارشده با دوز ۲۰نانومولار استروژن (۰/۰۲۹±۰/۴۷۲) نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۱$). اما این اختلاف بین دوزهای ۲۰نانومولار و ۱۰نانومولار 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 به‌طور دقیق شرح داده نشده است. به‌نظر 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 ایمونومودلاتوری در مکانیزم‌های دفاعی اصلی در برابر واکنش‌های مضر سیستم ایمنی را از خود نشان می‌دهند و بدین ترتیب به‌عنوان 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 TNFα (فاکتور نکروزکننده تومور آلفا) و اینترلوکین-۱ است [۱۹، ۲۰].

بعد از فعال‌سازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌واسطه تولید فاکتورهای محلول از قبیل نیتریک‌اکساید، پروستاگلاندین E2، اندولامین۲،۳دی‌اکسیژناز و IL-6 و مولکول‌های تنظیم‌کننده شامل گالکتین‌ها، PDL1، TGFβ 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 تاخیر 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 تری‌پپتید 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 درسلول‌های 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 آپوپتوز می‌شود. در بررسی ما کاهش آپوپتوز در نوتروفیل مجاورشده با مایع رویی و نیز سلول مزانشیم که با استروژن تیمار شده مشاهده شد که می‌توان گفت ممکن است به همین علت باشد. در بررسی دیگری [۲۶] نشان داده شده که تیمار سلول‌های مزانشیم با استروژن سبب افزایش زنده‌مانی نوتروفیل‌ها شده است که این اثر با کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ صورت می‌گیرد و همچنین سلول مزانشیم می‌تواند تیموسیت‌ها و سنتروبلاست‌ها را از آپوپتوز خودبه‌خودی محافظت کند و آنها را در مقابل مرگ القاشده از مسیر Fas محافظت نماید که می‌توان گفت احتمالاً این اثر را روی نوتروفیل با همین مکانیزم اعمال می‌کند.

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 تیمارشده 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 تاثیر 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 تاثیر قابل توجهی دارد که از این نظر می‌تواند در درمان بیماری‌های مرتبط با عملکرد نوتروفیل‌ها و پاسخ‌های فیزیولوژیک و حتی

پاتولوژیک نوتروفیل‌ها در عمل متقابل با سلول‌های مزانشیم 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 کارشناسی‌ارشد 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, Kroczak 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]
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, Hemeda 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.